

Klinische Relevanz unterschiedlicher Spermatozoenparameter für die Fertilisation *in vitro*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Heike Christina Müller
aus München

Giessen 1998

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie
-Hautklinik-

Abteilung Allgemeine Dermatologie und Andrologie

Leiter: Prof. Dr. Dr. W.-B. Schill

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: PD Dr. R. Henkel

Gutachter: PD Dr. R. Henkel

Gutachter:

Tag der Disputation:

Für meine Eltern

**Folgende Teile der Dissertation wurden bereits veröffentlicht oder zur
Veröffentlichung eingereicht:**

Abstracts:

1. Henkel,R, Müller,C, Hornik,S, Weißmann,N, Haidl,G, Schill,W-B und Gips,H (1991)
Zusammenhang zwischen Akrosinaktivität, Chromatinkondensation, akrosomaler Reaktion und Befruchtungsfähigkeit menschlicher Spermatozoen in der IVF.
Alete Wissenschaftlicher Dienst (1991) No.40, p. 145
2. Henkel,R, Müller,C, Miska,W and Gips,H (1992)
The acrosome reaction is a predictive parameter in rating the fertilizing capacity of human spermatozoa for IVF.
XIV. World Congress on Fertility and Sterility, No. 55, p. 50, Caracas, Venezuela
3. Schill,W-B, Henkel,R, Müller,C, Miska,W and Gips,H (1993)
Evaluation of acrosomal reaction by low temperature in human spermatozoa is of predictive value for IVF.
V. International Congress of Andrology 02.-06.05.93, Tokyo, Japan;
Miniposters, p 18
4. Henkel,R, Müller,C, Miska,W, Schill,W-B and Gips,H (1993)
Evaluation of acrosin activity by gelatinolysis is predictive for IVF.
J Assist Reprod Genet 10: 280 S
5. Henkel,R, Müller,C, Miska,W, Schill,W-B, Kleinstein,J and Gips,H (1993)
Gelatinolysis: A simple assay to evaluate acrosin activity to predict fertilization in IVF.
J Reprod Fertil Abstract Series 12: 56
6. Müller,C, Henkel,R and Schill,W-B (1998)
The use of the hypoosmotic swelling test to predict fertilization in IVF.
16th World Congress on Fertility and Sterility, 03.-09.10.98, San Francisco, USA (accepted)

Publikationen:

1. Henkel,R, Müller,C, Miska,W, Schill,W-B und Gips,H (1992)
Die Bestimmung der akrosomalen Reaktion in der andrologischen Diagnostik und ihre Bedeutung für die IVF. Eine vorläufige Analyse.
Fertilität 8: 27-30

2. Henkel,R, Müller,C, Miska,W, Gips,H and Schill,W-B (1993)
Determination of the acrosome reaction of human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro.
Hum Reprod 8: 2128-2132
3. Henkel,R, Müller,C, Miska,W, Gips,H and Schill,W-B (1994)
Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive for fertilization in vitro.
Fertility Digest 5: 10-13
4. Henkel,R, Müller,C, Miska,W, Schill,W-B, Kleinstein,J and Gips,H (1995)
Determination of the acrosin activity of human spermatozoa by means of a gelatinolytic technique. A simple, predictive method useful for IVF.
J Androl 16: 272-277
5. Henkel,R, Müller,C and Miska,W (1998)
Induction of acrosome reaction by low temperature is comparable to physiological induction by human follicular fluid.
Andrologia 30: 159-161

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	8
2. Ziel der Arbeit	23
3. Material und Methoden	24
3.1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials	24
3.1.1. Gewinnung humaner Spermatozoen	24
3.1.2. Gewinnung humaner Follikularflüssigkeit	24
3.2. In vitro-Fertilisation (IVF-Programm) und Fertilisationsrate	25
3.3. Klassische Spermatozoenparameter des Nativejakulats sowie nach Aufbereitung mit Swim up-Technik	27
3.4. Motilitätsbestimmung mittels Computergestützter Analyse	28
3.5. Beurteilung der Membranintegrität mittels Hypoosmotischem Schwelltest (HOS-Test)	30
3.6. Bestimmung der Akrosomreaktion (AR)	32
3.6.1. Nicht-physiologische Induktion der Akrosomreaktion mit Niedrigtemperatur	32
3.6.2. Physiologische Induktion der Akrosomreaktion durch humane Follikularflüssigkeit	33
3.6.3. Triple-Stain Technik	34
3.7. Akrosinaktivität	36
3.7.1. Bestimmung der Akrosinaktivität mittels Gelatinolysetechnik	36
3.7.1.1. Herstellung Gelatine-beschichteter Objektträger	37
3.7.1.2. Testdurchführung	38
3.7.1.3. Modifikationen der Gelatinolysetechnik	39
3.7.2. Photometrische Bestimmung der Akrosinaktivität	41
3.7.2.1. Extraktion von Akrosin	41
3.7.2.2. Enzymatischer Assay (BAEE/ADH-Nachweis)	42
3.8. Statistische Auswertung	44
4. Ergebnisse	46
4.1.1. Routinespermiogrammwerte des Nativejakulats sowie nach	

	Aufbereitung mit Swim up-Technik und Fertilisationsrate	46
4.1.2.	Computergestützte Motilitätsbestimmung	53
4.2.	Hypoosmotischer Schwelltest	54
4.3.	Akrosomreaktion	62
4.3.1.	Akrosomreaktion und Fertilisationsrate	62
4.3.2.	Physiologische und nicht-physiologische Induktion der Akrosomreaktion	66
4.4.	Akrosinaktivität	68
4.4.1.	Gelatinolyse Assay und Fertilisationsrate	68
4.4.2.	Photometrische Bestimmung der Akrosinaktivität	74
4.4.3.	Gelatinolyse Assay und photometrische Akrosinbestimmung	76
4.4.4.	Alternativmethoden der Gelatinolysetechnik	77
4.5.	Korrelationen der verschiedenen Spermatozoenfunktions- parameter miteinander	91
5.	Diskussion	92
5.1.	Klassische Spermatozoenparameter	93
5.1.1.	Konzentration	93
5.1.2.	Motilität	95
5.1.3.	Morphologie	98
5.2.	Hypoosmotischer Schwelltest	102
5.3.	Akrosomreaktion	107
5.4.	Akrosinaktivität	113
5.5.	In vitro-Fertilisation: „optimaler Spermatozoenfunktionstest“	118
6.	Zusammenfassung	122
7.	Literaturverzeichnis	125
8.	Abkürzungsverzeichnis	168
9.	Danksagung	170
10.	Lebenslauf	171

1. EINLEITUNG

Fruchtbarkeit - Historie und Gegenwart

Jahrhundertlang suchten die Menschen in den verschiedensten Kulturkreisen Mittel und Wege, Fruchtbarkeitsstörungen zu überwinden. Dazu zählen neben Götterbeschwörung und Wallfahrten auch die Verehrung von Fruchtbarkeitssymbolen. Eines solcher Lebens- und Fruchtbarkeitssymbole könnte die steinzeitliche (ca. 40000-16000 v. Chr.) „Venus von Willendorf“ sein (SPEERT, 1993). Diese kleine, 14 cm hohe Statue, stilisiert die vollen weiblichen Formen, die auch heute noch im Zentrum archaischer Rituale stehen.

Im Götterhimmel der Griechen prüft Priapus das Gewicht seines „Hauptorgans“ sogar auf der Waage. Die Griechen verehrten Hermes, den Sohn des Zeus und der Maja, als Fruchtbarkeitsgott. Aphrodite verkörperte die Lust und ihr Sohn Eros wurde als Gott der Leidenschaft angebetet. In der griechischen Mythologie gebar Zeus seine Lieblingstochter Athene, die Göttin der Weisheit, aus dem Kopf. Schädelspaltend leistete der Zeusbruder Hepharstos dem höchsten Gott Geburtshilfe (COTTERELL, 1989). Auch für viele griechische Ärzte des 6. bis 5. vorchristlichen Jahrhunderts begann die menschliche Fortpflanzung im Kopf. Der Samen entstehe - eine bereits im alten Ägypten gehegte Vorstellung - im Gehirn und steige dann über das Rückenmark hinab bis in die Geschlechtsorgane.

HIPPON VON REGION behauptete, der männliche Samen sei „dicht und stark“, der weibliche dagegen „dünnflüssig und schwächer“. Dieser Gegensatz entspricht der in der Antike weit verbreiteten Idee von der Unvollkommenheit alles Weiblichen. Anders bei den „Atomisten“, denen auch DEMOKRIT aus Abdera (5. Jhdt. v. Chr.) angehörte. Er postulierte die gleichwertige Beteiligung von Mann und Frau an der Fortpflanzung. Alle Körperteile seien aus Gruppen von „Atomen“ zusammengesetzt. Im „Samen“ verdichteten sich diese Atomgruppen beider Eltern und bewirkten die Weitergabe ihrer Eigenschaften. Das zukünftige Geschlecht des Kindes werde vom Mengenverhältnis des mütterlichen und väterlichen Samens bestimmt.

Nach der Lehre des griechischen Philosophen ARISTOTELES (384-322 v. Chr.) war das Kind als Produkt mütterlicher und väterlicher Sekrete zu sehen. Er postulierte jedoch, daß das menschliche Erbe lediglich aus dem männlichen Samen käme. Die angebliche Fähigkeit des Blutes, alle Organe bilden zu können, übertrage sich auf

den Samen, der sich durch „Kochung“ aus dem Blut bilde, „wegen seiner inneren Wärme eine Menge warmer Luft enthalten müsse“ und daher weiß sei. Demgegenüber beschränke sich die Aufgabe des weiblichen Sekretes zur Ernährung des Keimes durch das Menstrualblut.

Über Jahrhunderte beeinflussten diese Theorien die abendländischen Vorstellungen über den Fortpflanzungsprozeß bis in die Neuzeit. Daneben vermuteten andere Schulen, daß die eine Hälfte des Samens von der Frau und die andere vom Mann käme. PARACELSUS war einer der Gelehrten, der diese Hypothese propagierte. Es war bekannt, daß die Ejakulation die Voraussetzung für eine Schwangerschaft sei, aber niemand wußte welches Element im Samen dafür verantwortlich war. GARDINUS forderte 1623 „fertilisierende Partikel“ in der Samenflüssigkeit. Dreißig Jahre später stellte WILLIAM HARVEY, der Hofarzt des englischen Königs Charles I., die These auf: „Ex ovo omnia“ - alles Leben stammt aus dem Ei. Gleichzeitig attestierte er dem männlichen Samen eine immaterielle Zeugungskraft, die das „Weibchen“ fruchtbar macht - „wie Stahl, der aus Stein Feuer schlägt“. ANTONI VAN LEEUWENHOEK gelang die Entdeckung „kleiner Tierchen“ im Wasser, die er als „Animalcula“ bezeichnete. Im Jahr 1677 beschrieb er die „Animalcula“ in der Samenflüssigkeit des Menschen (SCHIERBECK, 1959). Er postulierte, daß das Ei nur eine nährnde Funktion habe: „Samentierchen“ schlüpfen in das Ei und verzehrten seinen Inhalt. Einige seiner Schüler, die „Animalkulisten“ glaubten im menschlichen Samen winzige Menschen zu beobachten. Aufgrund anderer Theorien war jedoch noch lange Zeit unklar, ob diese „Tierchen“ für den Befruchtungsvorgang wirklich von Bedeutung seien. So spekulierte 1749 BUFFON, daß die Samentierchen aus einem Fäulnisprozeß heraus entstünden. JOHANNES MÜLLER bezeichnete sie sogar noch 1814 als Parasiten (BAUTZMANN, 1945).

Mit der Erforschung der Zell-Theorie wurden sie jedoch als Körperzellen beurteilt und 1827 führte CARL ERNST VON BAER den Namen Spermatozoon ein. Zu diesem Zeitpunkt entdeckte er auch das Baer-Bläschen, die Säugereizelle. REGNIER DE GRAF (1641-1673) beschrieb als erster detailliert die Gametogenese. In seinem Buch *De Virorum Organis Generationi Inservientibus, De Clysteribus Et De Usu Siphonis In Anatomia* (DE GRAF, 1668) gab er 1668 einen ersten umfangreichen Überblick über den männlichen Reproduktionstrakt. Er beschrieb die Tubuli seminiferi, die Vasa deferentia und erkannte, daß der fertilisierende Anteil des Samens in den Hoden gebildet wird (BRENNER, 1981). Die Wissenschaft war jetzt an dem Punkt

angelangt, daß die aus den Ovarien stammenden Eizellen von der Samenflüssigkeit, insbesondere den Spermatozoen, fertilisiert werden. Aber es gab noch immer keine Erklärung dafür, wie die Spermatozoen die Eizelle erreichen und wo und auf welche Weise im weiblichen Körper ihre Penetration stattfindet.

Nachdem 1840 der Engländer MARTIN BARRY (BARRY, 1840) beschrieben hatte, daß das Spermatozoon in die Eizelle eindringt, beobachtete OSCAR HERTWIG erstmals 1876 (HERTWIG, 1876) an durchsichtigen Seeigeleiern die Vereinigung der Zellkerne von Spermatozoon und Eizelle. Im gleichen Zeitraum (1849) führte ARNOLD ADOLF BERTHOLD, ein Göttinger Physiologe, testikuläre Transplantationen durch. Nach Entfernung des Hodens und Verpflanzung an eine andere Körperstelle, konnte beim Gockel die Atrophie seines Kammes verhindert werden (BERTHOLD, 1849). Daraus folgerte er, daß der Hoden sich über das Blut auf die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale auswirke. Somit war er der erste, der hormonelle Wirkungsweisen deklarierte.

Im Jahre 1913 erschien das Buch *Sterility in the Male and Female and its Treatment* von MAX HÜHNER (1873-1947). Hierin berichtet er über Resultate einer großen Zahl postkoitaler Untersuchungen und wies auf deren Bedeutung bei der Sterilitätsdiagnostik hin. Er beschrieb den bis heute gültigen Postcoitaltest, nachdem er bis 5,5 Tage nach dem Koitus lebende Spermatozoen im Cervikalmukus gesehen hatte.

Die Amerikaner JOHN ROCK und M. F. MENKIN befruchteten im Jahre 1944 erstmals menschliche Eizellen im Reagenzglas (HERTIG et al., 1956). Mit der Entwicklung des Phasenkontrastmikroskops im Jahre 1948 von AUSTIN und SMILE konnten erste detaillierte Beobachtungen an lebenden Eizellen gemacht werden. Neun Jahre später gelang MIN CHEUN CHANG (1957) beim Kaninchen die erste in vitro-Fertilisation eines Säugetieres, aus welcher lebende Junge hervorgingen. Ein ganz bedeutender Meilenstein für die Reproduktionsmedizin war der 25. Juli 1978 in Oldham, England: Die Geburt der Louise Brown - das erste außerhalb des Körpers gezeugte Kind. Die wissenschaftlichen „Väter“ des „Retortenbabys“ sind der englische Gynäkologe PATRICK STEPTOE und der Tierphysiologe ROBERT EDWARDS (STEPTOE & EDWARDS, 1978; EDWARDS et al., 1980). Ein weiterer Durchbruch war im Jahre 1992 das direkte Injizieren eines einzelnen Spermatozoons in die Eizelle (Mikroinjektion, intracytoplasmatische Spermatozoen Injektion=ICSI) (PALERMO et al., 1992).

Die hiermit in den letzten Jahren weltweit erzielten großen Fortschritte in der Erforschung und dem Verständnis des Fortpflanzungsprozesses finden ihren sichtbaren Niederschlag in zunehmender praktischer Anwendung moderner Methoden der Biotechnik in der Reproduktion. Mit intrauteriner Insemination (IUI), in vitro Fertilisation (IVF) und ICSI sind Techniken entwickelt worden, die mehr und mehr die Behandlung von Patienten dominieren, die Infertilitätskliniken aufsuchen. Sowohl weibliche als auch schwere männliche Fertilitätsstörungen können damit erfolgreich behandelt werden.

Insbesondere für das Verständnis der Anwendung von IUI und IVF ist es wichtig, einen Überblick über die biologischen Mechanismen der Zell-Zell-Interaktionen, welche den Fertilisationsprozeß regulieren, zu erlangen. Im Gegensatz dazu werden bei der Mikroinjektion sämtliche physiologischen Barrieren für den Eintritt der Spermatozoen in die Eizelle umgangen.

Die Vereinigung männlicher und weiblicher Gameten stellt den ersten Schritt zur Entwicklung eines neuen Individuums dar. Bei dem Fertilisationsprozeß handelt es sich um ein multifaktorell determiniertes Geschehen, bei dem sowohl Spermatozoen, als auch Oozyte sowie das umgebende Milieu des weiblichen und männlichen Reproduktionstrakts von „optimaler Qualität“ sein sollten. Falls ein wichtiger morphologischer bzw. funktioneller Parameter in der „Befruchtungskaskade“ ausfällt, kann dies Infertilität zur Folge haben. Die männliche Sterilität wird sowohl von der Anzahl als auch der Qualität der Spermatozoen bestimmt, wobei die Ursache meistens während der Spermatozoenproduktion und -differenzierung während der Spermatogenese im Testis zu suchen ist. Daneben spielen auch das Lebensalter und einige exogene Faktoren, wie Temperatur, Infektionen und Umweltgifte eine Rolle. Wenn die Spermatozoen aus dem männlichen schließlich in den weiblichen Genitaltrakt gelangen, werden sie von den jeweiligen umgebenden Bedingungen beeinflusst. Bei der Eizelle muß zum Beispiel nicht nur der Ooplast (TROUNSON & WEBB, 1984), sondern auch die Zona pellucida (TESARIK & KOPECNY, 1986; FAMILIARI et al., 1988; TESARIK et al., 1988b) gereift sein. Die Zona muß sowohl die Fähigkeit zur Spermatozoen-Bindung (FRANKEN et al., 1991a, 1993; BEDFORD & KIM, 1991; OEHNINGER et al., 1991) aufweisen, als auch zur Induktion der Akrosomreaktion in der Lage sein. Auf der anderen Seite muß das Spermatozoon mit bestimmten Strukturen ausgestattet sein, um die Oozyte zu erreichen und schließlich mit dem Oolemma zu fusionieren.

Bau der Spermatozoen

Die Aufgabe der männlichen Keimzelle ist es, seine genetische Information in die Eizelle zu transportieren. Um das Ziel der erfolgreichen Fertilisation erfüllen zu können, muß das Spermatozoon mit speziellen morphologischen Strukturen ausgestattet sein, die mit den Mechanismen der Fortbewegung, der Penetration und Fusion der Eizelle, einschließlich der dafür notwendigen Energielieferung assoziiert sind. Diesbezüglich ist das Spermatozoon in zwei morphologisch und funktionell unterscheidbare Regionen gegliedert: Den Spermatozoonkopf und das Flagellum (Abb. 1).

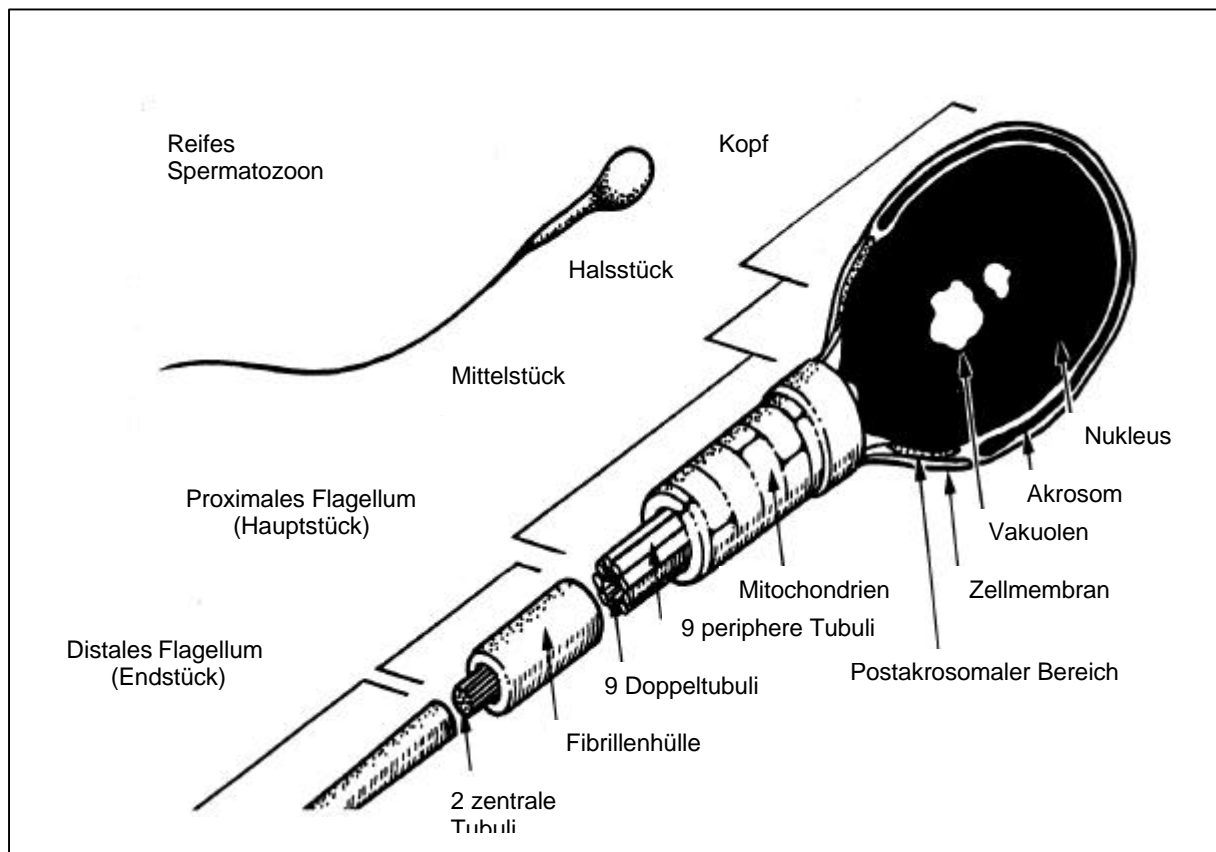


Abbildung 1: Schematische Darstellung des licht- und elektronenmikroskopischen Aufbaus eines menschlichen Spermatozoons (modifiziert nach ACOSTA & KRUGER, 1996).

Der Spermatozoenkopf

Beim Menschen hat der Spermatozoenkopf eine längsovale Form und ist 4,0-5,5 µm lang und 2,5-3,5 µm breit. Im vorderen Bereich liegt dem Spermatozoenkopf kappenförmig das Akrosom (griech. *Akron* die Spitze, der Gipfel; *soma* der Körper), ein membrangebundenes Organell, welches während der Spermatogenese aus dem Golgi-Apparat der Spermatide entsteht, auf (LEBLOND & CLERMONT, 1952; FAWCETT, 1975; BELLVE & O'BRIEN, 1983). Dieses modifizierte Lysosom nimmt etwa 40%-60% des Spermatozoenkopfes ein und enthält eine Reihe hydrolytischer Enzyme. Als wichtigste akrosomale Enzyme sind Hyaluronidase und Akrosin, eine trypsinähnliche Proteinase, anzusehen. Erstere soll die Penetration des Cumulus oophorus erleichtern, wohingegen Akrosin als Schlüsselenzym zur Penetration der Zona fungieren soll (SCHILL, 1975; SCHILL et al., 1988). Begrenzt wird die akrosomale Matrix durch spezielle Membranen. Die „äußere akrosomale Membran“ befindet sich unter der Plasmamembran, die „innere akrosomale Membran“ liegt der Kernmembran auf. Das Akrosom ist die funktionelle Struktur für die Akrosomreaktion, Zonabindung und Zonapenetration.

Das Flagellum

Die morphologischen Strukturen, welche mit der Motilität assoziiert werden, sitzen im Fortbewegungsapparat, dem Flagellum. Dieses ist beim Menschen mit 50-60 µm etwa zehnmal länger als der Spermatozoenkopf (CUMMINS & WOODALL, 1985). Lichtmikroskopisch kann es in vier Hauptsegmente unterteilt werden: Das Halsstück (etwa 1 µm), Mittelstück (etwa 6 µm), Hauptstück (etwa 45 µm) und Endstück (etwa 5 µm). Im elektronenmikroskopischen Querschnitt des Flagellums ist der typische Aufbau einer Geißel mit zentral gelegnem Axonem zu erkennen. Um zwei zentrale, von einer Scheide umgebene Tubuli, sind periphere Doppeltubuli ringförmig angeordnet. Diese setzen sich aus A- und B-Tubuli zusammen, wobei jeder A-Tubulus auf den B-Tubulus des benachbarten Paares Dyneinarme richtet (GIBBONS, 1981). Über deren Auf- und Abbau wird eine Verschiebung der Tubuli gegeneinander, d.h. eine Geißelbewegung und somit die Fortbewegung erreicht. Im Mittelstück und anfänglichen Hauptstück befinden sich die Mantelfasern als nicht kontraktile, passiv-elastische Elemente (BACCETTI et al., 1973; SWAN et al., 1980;

HENKEL et al., 1992; STALF et al., 1993). Sie ermöglichen die Progressivmotilität (BELLVE & O'BRIEN, 1983) und sollen als Schutz gegen die bei der Ejakulation auftretenden Scherkräfte dienen (BALTZ et al., 1990). Das Mittelstück des Flagellums enthält die Mitochondrien, die dem Spermatozoon zur Energiegewinnung dienen (VAN DEURS & LASTEIN, 1973).

Der Fertilisationsprozeß

Spermatozoen-Transport und -Motilität

Die männlichen Keimzellen, die von den Tubuli seminiferi der Testes freigesetzt werden, sind zwar strukturell differenziert, jedoch hinsichtlich ihrer Funktionsfähigkeit zunächst unreif. Nachdem sie in den Epididymis übergetreten sind, reifen sie zu befruchtungskompetenten Gameten (epididymale Reifung; HINRICHSSEN-KOHANE et al., 1984). In der Cauda epididymis entwickeln die Keimzellen ihre Eigenbeweglichkeit (AUSTIN, 1985). Diese wird unter natürlichen Umständen ausgelöst, wenn die reifen Nebenhodenspermatozoen während der Ejakulation mit Komponenten des Seminalplasmas, v. a. aus Prostata und Samenblase, vermischt werden (COOPER, 1986). Durch den Kontakt mit dem Seminalplasma erhalten die männlichen Gameten einerseits ihre Beweglichkeit, andererseits wird die Plasmamembran mit sog. „sperm-coat“-Antigenen (Dekapazitationsfaktoren) überzogen, die das Akrosom stabilisieren und der Keimzelle vorübergehend ihre Befruchtungskompetenz nehmen (OLIPHANT et al., 1985). Diese Dekapazitationsfaktoren werden während des physiologischen Reifungsvorganges der Spermatozoenmembran, der Kapazitation, eliminiert und modifiziert (YANAGIMACHI, 1981). Nach der Ejakulation in die Vagina gelangen die Spermatozoen in den Cervikalkanal, werden überwiegend passiv durch den Uterus in die 12-15 cm entfernten Tuben transportiert (CROXATTO et al., 1978; DIAZ et al., 1980), um schließlich im Bereich der Ampulle eine stärkere Beweglichkeit zu entwickeln. Um zur befruchtungsfähigen humanen Eizelle zu gelangen, müssen sie verschiedene physiologische Hindernisse wie die Cervix-Mucus-Barriere, die anatomische Enge des Uterus-Tubenwinkels und auch gegengerichtete dynamische Kräfte (z. B. der Gegenstrom der Oviduktflüssigkeit und der Cilienschlag des Tubenepithels) überwinden (Abb. 2; Tab. 1).

Spermatozoen - Eizell - Interaktion

Cumulus- Passage

Der erste Schritt der Spermatozoen-Eizell-Interaktion (Abb. 2; Tab. 1) beinhaltet die Cumulus-Passage, zu der nur kapazitierte Spermatozoen befähigt sind und die einige Minuten in Anspruch nimmt (CORSELLI & TALBOT, 1987; CUMMINS & YANAGIMACHI, 1982). Der strukturelle Zusammenhalt des Cumulus, welcher durch eine hyaluronsäurehaltige Substanz gewährleistet ist, wird relativ kurze Zeit nach der Fertilisation durch Hyaluronidase aufgelöst. Dieses Enzym kommt einerseits im Spermatozoon vor, andererseits wird es auch vom Epithel des Ovidukts sezerniert.

In vitro wird der Cumulus zur Behandlung männlicher Infertilität mechanisch oder chemisch während der *in vitro* Fertilisation (IVF) aufgelöst, um den Spermatozoen den Weg zur Oozyte zu erleichtern. Dies sollte nicht vollständig und zeitlich nicht zu früh erfolgen, da der Cumulus Proteoglykane produziert und sezerniert, die an der Zonareifung beteiligt zu sein scheinen (TESARIK & KOPECNY, 1986).

Tabelle 1: Liste verschiedener Spermatozoen-Testverfahren zu den jeweiligen Schritten des Fertilisationsprozesses (s. Abb. 2).

Spermatozoenfunktionstests	Zeitpunkt im Fertilisationsprozeß
1. Morphologie	1a
2. Computergestützte Motilitätsmessung	1a, 3
3. Nukleäre Stabilität (Anilinblaufärbung)*	1a
4. Hypoosmotischer-Schwelltest	1a
5. Cervix-Mucus-Test	1a, 1b
6. Spermatozoen-Kapazitations Assay (Zona-Bindung)	3
7. Akrosomreaktions Assay (Triple-Stain)	7
8. Spermatozoen-Penetrations Assay	1a, 3, 7, 9, 11
9. Hemizona Assay	1a, 3, 6
10. Akrosinaktivität	1a, 3, 6, 7, 8
11. IVF und Techniken der assistierten Reproduktionsmedizin	1a, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12

* (TERQUEM & DADOUNE, 1983)

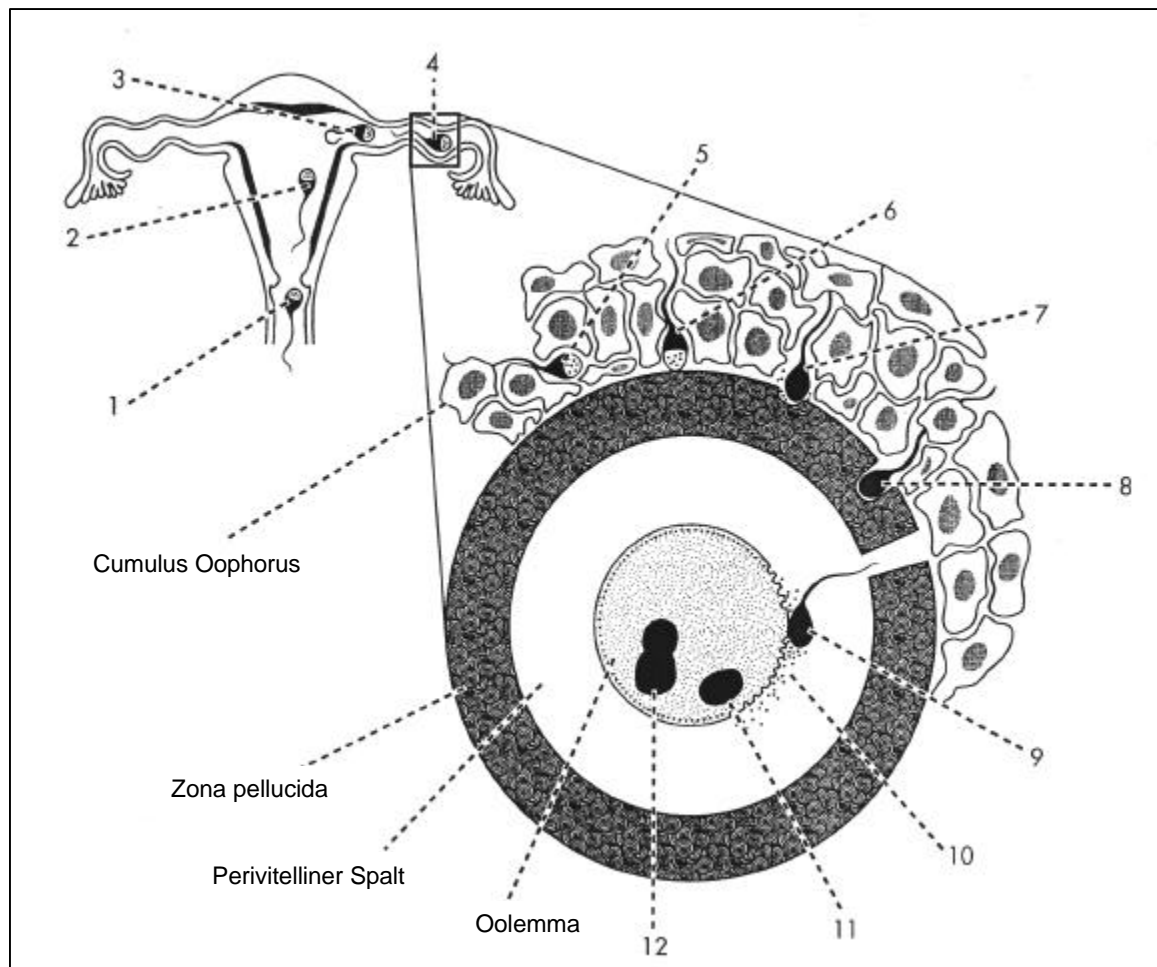


Abbildung 2: Der Fertilisationsprozeß: (1a) Deposition der Spermatozoen; (1b) Zervix-Mucus-Penetration; (2) Wanderung durch den Uterus; (3) Spermatozoen Kapazitation und Hyperaktivierung in der Tube; (4) Vergrößerung der Spermatozoen-Eizell-Interaktion; (5) Penetration durch den Cumulus oophorus; (6) Zona-Bindung; (7) Akrosomreaktion; (8) Zona-Penetration; (9) Fusion mit der Oozytenmembran; (10) Cortikalreaktion; (11) Dekondensation des Nukleus; (12) Verschmelzung der Nuklei; (13) Entwicklung und Implantation des Embryos (nicht dargestellt).

(modifiziert nach LIPSHULTZ et al., 1997).

Kapazitation und Akrosomreaktion

Im weiblichen Genitaltrakt müssen die Spermatozoen einige essentielle physiologische Veränderungen durchlaufen, bevor sie schließlich die Zona pellucida und die Zellmembran der Eizelle zu durchdringen vermögen. Der erste wichtige Prozeß stellt einen physiologischen Reifungsvorgang der

Spermatozoenplasmamembran dar und ist die Voraussetzung für die Akrosomreaktion (AR). Diese essentiellen Alterationen werden als Kapazitation bezeichnet (AUSTIN, 1951, 1960; CHANG, 1984). Der gesamte Ablauf ist noch nicht vollkommen aufgeklärt, doch sprechen alle Anzeichen dafür, daß Veränderungen der Plasmamembran des gesamten Spermatozoons für die Kapazitation verantwortlich sind. Bestimmte Oberflächenantigene werden von der Zellmembran eliminiert oder modifiziert (AUSTIN, 1960). Dies führt zu einer starken Membrandepolarisation (WILLIAMS, 1972; YANAGIMACHI et al., 1973; AUSTIN, 1975; OLSON & HAMILTON, 1978). Über Modifikationen der Lipidzusammensetzung (v.a. des Cholesterol-Phospholipidverhältnisses) (RAVNIK et al., 1993) zeigt sich eine Veränderung der Membranfluidität (LANGLAIS & ROBERTS, 1985; YANAGIMACHI, 1994; VISCONTI et al., 1998). Dies sind die Voraussetzungen für die Befähigung der Spermatozoen zur AR und Bindung an die Zona pellucida (ZP) (FRASER, 1998; JAISWAL et al., 1998). Unzweifelhaft wird eine deutliche Aktivitätssteigerung bei kapazitierten Spermatozoen festgestellt, welche sich in einer Modifikation des Bewegungsmusters im Sinne einer Hypermotilität äußert. Die Spermatozoen bewegen sich nicht mehr progressiv, statt dessen zeigt sich ein kräftiger Flagellenschlag mit seitlicher Kopfauslenkung (BURKMAN, 1990). Dieser Hyperaktivierung wird eine Rolle bei der mechanischen Penetration der Zona pellucida zugeschrieben (KATZ et al., 1993) und ist ein frühes, meßbares Merkmal der Kapazitation. Beim Menschen, wie auch bei den meisten Säugetieren, nimmt die Kapazitation einige Stunden in Anspruch und beginnt, wenn die Spermatozoen das Seminalplasma verlassen (ROBERTSON et al., 1988). Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), welches in ejakulierten menschlichen Spermatozoen nachweisbar ist, wird während der Kapazitation freigesetzt und scheint eine Rolle bei der sich anschließenden AR (FORESTA et al., 1991; KÖHN et al., 1995) und Zonabindung (HAGMAN et al., 1998) zu spielen. Experimentell zeigte sich, daß die Kapazitation bei den meisten Säugetierspezies hormonabhängig verläuft. Das östrogendominierte Milieu der Follikel und Tuben fördert den Kapazitationsablauf. Unter Wirkung von Progesteron entfalten Faktoren dieses Milieus hemmende Einflüsse auf die Kapazitation, so daß sie entweder nicht zustandekommt oder experimentell sogar rückgängig gemacht werden kann (WILLIAMS, 1972).

In vitro kommt es zur Kapazitation menschlicher Spermatozoen, wenn das Seminalplasma durch einen einfachen Waschschrift entfernt wird und anschließend die gewaschenen Zellen in einem geeigneten Kulturmedium, welches Serum oder Albumin enthält, resuspendiert werden. Das Bewegungsmuster kann mittels computergesteuerter Analyse der Spermatozoen ermittelt werden.

Nach der Kapazitation erfolgt normalerweise die AR. Die ultrastrukturellen Veränderungen während der AR wurden erstmal von BARROS et al. (1967) beschrieben und sind in Abbildung 3 schematisch aufgezeigt. Es handelt sich um einen modifizierten exozytotischen Prozeß. Dabei kommt es zu partiellen Fusionen zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran. Dies führt zur Bildung von Hybridmembranvesikeln, gefolgt von einer Perforation bis völligen Ablösung größerer Akrosomanteile. Mit den Hybridmembranvesikeln wird der akrosomale Inhalt, der eine Reihe hydrolytischer Enzyme (z.B. Hyaluronidase, Akrosin und andere Proteasen, Glukuronidase und N-Acetyl-Glukosidaminidase) enthält, freigesetzt. Im Bereich des Äquatoralsegments des Spermatozoons bleibt die äußere akrosomale Membran erhalten und fusioniert mit dem Plasmalemm. An dieser Stelle des postakrosomalen Teils beginnt später die Vereinigung der Zellmembranen beider Gameten. Im Anschluß an die AR wird die innere akrosomale Membran exponiert und zur freien rostralen Oberfläche des Spermatozoons (AUSTIN & BISHOP, 1958; BARROS et al., 1967; MEIZEL, 1985; LANGLAIS & ROBERTS, 1985; YUDIN et al., 1988). Auf ihr bleiben Akrosin- und Proakrosinmoleküle zunächst noch zum Teil fest verankert und binden an die Zona pellucida, so daß nach partieller Aktivierung dieser proteolytischen Enzyme das hochmolekulare, vernetzte Material der ZP aufgelöst werden kann.

Die molekularen Mechanismen, die bei der AR eine Rolle spielen, sind schon zum Teil aufgeklärt. Einer dieser molekularen Signalwege könnte über die Stimulation von G-Proteinen zur Aktivierung der Phospholipase C erfolgen und über spannungsabhängige Ionenkanäle den für die AR charakteristischen massiven Calcium-Influx auslösen (STOREY & KOPF, 1991). Desweiteren bewirken die G-Proteine die Produktion von cAMP, wobei es über weitere Schritte zur Phosphorylierung von assoziierten Proteinen kommt (BRUCKER & LIPFORD, 1995). ZANEVELD et al. (1991) postulierten mindestens drei „second messenger pathways“,

die über Proteinkinase A, Proteinkinase C und eine Guanylcyclase zu einer Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels führen.

Die AR kann durch eine Reihe von physiologischen und nicht-physiologischen Induktoren ausgelöst werden. Von besonderer Bedeutung ist die Frage nach der Beteiligung von Produkten der Ovulation und damit den natürlichen Induktoren dieses Prozesses, von denen bisher die folgenden Substanzen beschrieben wurden: Follikularflüssigkeit (MUKERJEE & LIPPES, 1972; OLIPHANT et al., 1977; SUAREZ et al., 1986; MISKA et al., 1994), Cumulus oophorus (SIITERI et al., 1988), Glykoproteine der Zona (BLEIL & WASSARMAN, 1983; CROSS et al., 1988; HENKEL et al., 1998a), Progesteron (OSMAN et al., 1989; BLACKMORE et al., 1990; MORALES et al., 1992; FEHL et al., 1995), Serumalbumin (COHEN et al., 1982), Glykosaminoglykane (wie Hyaluronsäure und Heparin; HANDROW et al., 1982; DELGADO et al., 1988), hydrolytische Enzyme (insbesondere Proteasen; SHINOHARA et al., 1985; VAN DER VEN et al., 1985; DeJONGE et al., 1989), biogene Amine (z. B. Katecholamine; MEIZEL & WORKING, 1980), Arachidonsäuremetabolite sowie schwefelhaltige β -Aminosäuren (MEIZEL, 1985).

Neben diesen physiologischen Induktoren sind eine Reihe von nicht-physiologischen Stimulatoren, eingeteilt in chemische und physikalische, zur Auslösung der AR bekannt. Experimentell kann durch Verwendung von Calcium-Ionophor A23187 (GREEN, 1978; JAMIL & WHITE, 1981; MORTIMER & CAMENZIND, 1989) Calcium membrangängig gemacht und dadurch die AR induziert werden. Mit diesem Induktor werden maximale Werte erreicht (TESARIK, 1985). Darüber hinaus lässt sich durch den physikalischen Induktor, Niedrigtemperatur (4°C), ebenso die AR auslösen (MAHI & YANAGIMACHI, 1973; SÁNCHEZ et al., 1991).

Einhergehend mit dem Zelltod der Spermatozoen kann es aufgrund der im akrosomalen Inhalt enthaltenen Hydrolasen zum „Selbstverdau“ des Akrosoms kommen. Diese degenerative akrosomale Reaktion bei avitalen Spermatozoen wird auch als „falsche AR“ bezeichnet (MEIZEL, 1978) und sollte nicht mit der physiologischen, „echten“ AR vitaler Zellen verwechselt werden (YANAGIMACHI, 1988), welche die charakteristische Membranfusion zwischen äußerer Akrosommembran und Plasmamembran im Bereich des Äquatoralsegments aufweisen.

Diverse Techniken zur Bestimmung der AR sind entwickelt worden, um *in vitro* die Fähigkeit humaner Spermatozoen zur Induktion der Akrosomreaktion zu untersuchen. Eines der am häufigsten angewendeten Testverfahren ist die Triple-Stain Technik (TALBOT & CHACON, 1981), welche auch in dieser Arbeit verwendet wurde.

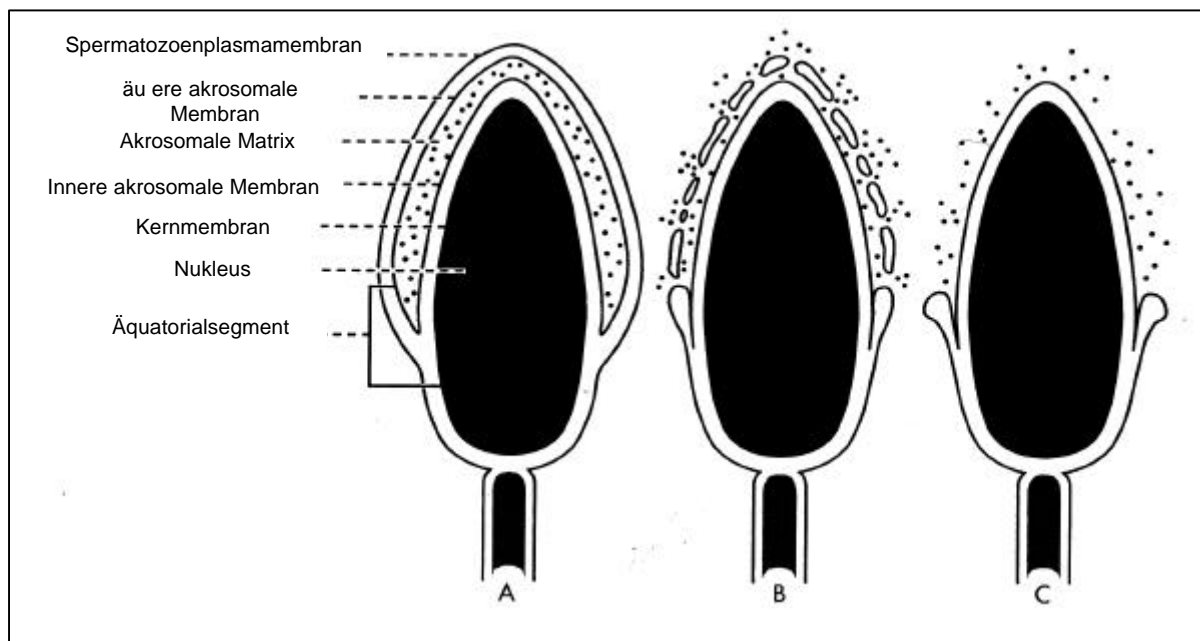


Abbildung 3: Akrosomreaktion (AR)

A) Vor der AR

B) Während der AR: Multiple Fusionen zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomalen Membran mit Freisetzung des akrosomalen Inhalts

C) Abgeschlossene AR mit Exponieren des äquatorialen Segments.

(modifiziert nach LIPSHULTZ et al., 1997)

Spermatozoen-Zona-Interaktion

Die ZP ist eine aus Glykoproteinen aufgebaute Membran, die die Oocyte umgibt und von ihr gebildet wird. Wie schon angesprochen, stellt sie eine physiologische Barriere für die Spermatozoen bei der Fertilisation dar. Die Spermatozoen-Zona-Interaktion ist ein zentraler Schritt im Fertilisationsprozeß, da auf molekularer Ebene die Basis zur Speziespezifität liegt (SWENSON & DUNBAR, 1982; MENKVELD et al., 1991). Darüber hinaus erfolgt auch der Polyspermieblock (WOLF, 1981; SATHANANTHAN

& TROUNSON, 1982). Charakteristischerweise ist die Säugetierzona im wesentlichen aus den drei Glykoproteinen aufgebaut, die WASSARMAN (1987) im Mausmodell ZP1, ZP2 und ZP3 bezeichnete. ZP1 soll als Strukturprotein dienen, ZP2 sowie ZP3 als Bindungsproteine. ZP3 soll einerseits als Ligand für die Rezeptoren der Spermatozoen fungieren, andererseits auch als Induktor der AR. Für ZP2 wird eine sekundäre Bindungsfähigkeit gefordert (BLEIL & WASSARMAN, 1986). Mehrere Komponenten der Plasmamembran und der inneren akrosomalen Membran sollen neben den Zona pellucida Proteinen Rezeptoreigenschaften besitzen, unter welchen die Proakrosin/Akrosin-Moleküle eine besondere Rolle spielen (JONES et al., 1988; JONES, 1991; TÖPFER-PETERSEN & HENSCHEN, 1987; URCH & PATEL, 1991).

In vitro kann die Spermatozoen-Zona-Bindung mit dem Hemizona Assay, der gute prädiktive Werte hinsichtlich der Fertilisation *in vitro* zeigt (YANAGIMACHI et al., 1976; BURKMAN et al., 1988; FRANKEN et al., 1993), beurteilt werden.

Akrosin

Akrosin, welches während der AR freigesetzt wird, ist eine trypsinähnliche Serinproteinase und kommt nur in Säugetierspermatozoen vor (STAMBAUGH, 1978; HARRISON et al., 1982; HEDRICK et al., 1988; ZANEVELD & DeJONGE, 1991). Der Proakrosin/Akrosin-Komplex ist während der AR noch zum Teil an der inneren akrosomalen Membran gebunden. Die nichtenzymatische Moleküldomäne des Proakrosins bindet an ZP2 und nach partieller Aktivierung soll der enzymatisch aktive Teil (Akrosin) für die lokal engumschriebene Lyse der Zona verantwortlich sein (URCH et al., 1985a,b). Eine zusätzliche mechanische Komponente für die Penetration der Zona stellt die hyperaktive Bewegung der Spermatozoen dar (KATZ & YANAGIMACHI, 1981; BEDFORD, 1983). Neben der Zonabindung und -penetration der Spermatozoen (ROGERS & BENTWOOD, 1982; POLAKOSKI & SIEGEL, 1986; TÖPFER-PETERSEN & HENSCHEN, 1987; TESARIK et al., 1988a) werden verschiedene Funktionen des Akrosins diskutiert; unter anderem die Mitwirkung an der Kapazitation, die Triggerung der AR (MARUSHIGE & MARUSHIGE, 1978; MEIZEL, 1985; HABENICHT, 1987), die Beteiligung an der Chromatindekondensation während der Ausbildung des männlichen Vorkerns (HABENICHT, 1987; DeJONGE et al., 1989; NUZZO et al., 1990) und die Stimulation

der intra-uterinen Spermatozoen-Migration durch Freisetzung von Kininen aus Kininogenen (SCHILL et al., 1979; KANEKO & MORIWAKI, 1981; SCHILL & MISKA, 1992). Akrosin ist biochemisch gut charakterisiert, seine biochemische Struktur aufgeklärt (FOCK-NÜZEL et al., 1984; SCHILL et al., 1988) und der Genort lokalisiert (KLEMM et al., 1991; KREMLING et al., 1991). In epididymalen und frisch ejakulierten Spermatozoen kommt Akrosin in einer zymogenen Form (Proakrosin) vor und wird durch limitierte Proteolyse (POLAKOSKI & SIEGEL, 1986) zum aktiven Akrosin aktiviert. Diese Konvertierung kann durch verschiedene natürliche und synthetische Akrosininhibitoren (z.B. Benzamidine) verhindert werden (BROWN & HARRISON, 1978). Fehlt Akrosin oder wird es durch Inhibitoren gehemmt, kommt es nicht zur Fertilisation (STAMBAUGH & BUCKLEY, 1970; ZANEVELD et al., 1970; 1971; WOLFF et al., 1976; SCHILL et al., 1981; LIU & BAKER, 1993; MOORE et al., 1993).

Um die proteolytische Aktivität des Akrosins *in vitro* zu bestimmen, sind eine Reihe von Testverfahren entwickelt worden, so verschiedene photometrische Methoden oder die Gelatinolysetechnik, welche in dieser Arbeit angewendet wurden.

Spermatozoon-Eizell-Fusion

Während der AR kommt es neben den schon erwähnten Membranveränderungen auch zu zusätzlichen Proteinmodifikationen im äquatorialen und postakrosomalen Bereich des Spermatozoonkopfes. Dies ermöglicht in dieser Region die Fusion zwischen den Zellmembranen von männlicher und weiblicher Gamete (ROCHWERGER et al., 1992). Auch die Eizelle wird aktiviert, was durch die Cortikalreaktion (Exozytose kortikaler Granula; später Polyspermieblock) gekennzeichnet ist. In der Folge vollendet sie die 2. Reifeteilung. Im Anschluß an die Plasmogamie wird die Karyogamie vollzogen. Mit Ausbildung der Zygote ist die zelluläre Befruchtung (Gametenverschmelzung; Syngamie) abgeschlossen und es erfolgt die 1. Furchungsteilung (ALBERTS et al., 1990).

In vitro kann die Fusionsfähigkeit menschlicher Spermatozoen mit dem 1976 von YANAGIMACHI et al. entwickelten Hamster-Ovum-Penetrationstest beurteilt werden.

2. ZIEL DER ARBEIT

In Deutschland sind ca. 1,5 Millionen Paare im reproduktionsfähigen Alter (>15% aller Paare) vorübergehend oder dauerhaft ungewollt kinderlos (BRUCKERT, 1991). Der andrologische Faktor spielt bei der Hälfte der Paare eine entscheidende Rolle. Bei etwa 30% dieser Männer kann die Ursache nicht geklärt werden, sie gehören der Gruppe der Patienten mit „idiopathischer Sterilität“ an.

Einige Studien haben gezeigt, daß die Basisejakulatuntersuchung der klassischen Spermatozoenparameter, wie Zellzahl, Spermatozoenmorphologie und -motilität nur begrenzt zur Prognose sowohl natürlicher als auch assistierter Reproduktion dient. Deshalb wurden zur Untersuchung der Spermatozoenfunktionen im Rahmen der Spermatozoen-Oozyten-Interaktion eine Reihe von Spermatozoen-Funktions-Assays entwickelt: Computerassistierte Motilitätsanalyse, Hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test), Bestimmung des akrosomalen (Triple-Stain Technik) und nukleären Status der Spermatozoen (Anilinblaufärbung), Hamster-Ovum-Penetrations-Test (HOP-Test) und Hemizona Assay.

Das Ziel dieser Arbeit ist zum einen die Korrelation der klassischen Ejakulatparameter (Spermatozoenkonzentration, -morphologie, -motilität, Progressivmotilität) sowie einiger Spermatozoenfunktionen mit der Fertilisation in vitro, welche die natürlichen Verhältnisse als Kombination aller Parameter widerspiegelt. Zum anderen auch die Bestimmung einzelner Vorhersagewerte für den Einsatz in der andrologischen Diagnostik. Dabei sollte der HOS-Test zur Überprüfung der funktionellen Membranintegrität der Spermatozoen eingesetzt, die Akrosinaktivität mit verschiedenen Modifikationen der Gelatinolysetechnik als auch mit einem photometrischen Testverfahren bestimmt werden und der akrosomale Status der Spermatozoen mit der Triple-StainTechnik untersucht werden. Bei der Bestimmung der AR sollte die Induktion mittels Niedrigtemperatur mit einem physiologischen Induktor, humane Follikularflüssigkeit, verglichen werden. Die Ergebnisse der entsprechenden Spermatozoenfunktionstests sollten jeweils im IVF-Programm der Universitätsfrauenklinik Gießen evaluiert und Vorhersagewerte für die andrologische Diagnostik als verwertbare Methode etabliert werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

3.1.1. Gewinnung humaner Spermatozoen

Die für diese Arbeit benötigten Ejakulatproben wurden Ejakulaten von 204 Männern, deren Ehefrauen an einem in vitro-Fertilisationsprogramm (IVF-Programm) des Instituts für Reproduktionsmedizin, Gießen, teilnahmen, entnommen. Es handelte sich dabei jeweils um ein Aliquot der Ejakulate, mit denen auch die Oozyten inseminiert wurden.

Die Ejakulatgewinnung erfolgte nach einer Karenzzeit von 3-7 Tagen durch Masturbation am selben Tag, an dem auch die Eizellen gewonnen wurden. Die Ejakulate wurden in Polypropylenbechern (100ml, 76x60mm; Sarstedt, Nümbrecht, FRG) abgegeben. Nach Verflüssigung der Ejakulate wurden diese nach den WHO-Kriterien von 1987 untersucht. Sowohl vom Nativsperma als auch nach Aufbereitung mittels Swim up-Verfahren wurden Spermioogramme erstellt.

Für die Versuchsreihe der Modifikationen der Gelatinolysetechnik (3.7.1.3) wurden zusätzlich 118 Ejakulatproben aus der Andrologischen Ambulanz der Hautklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet.

3.1.2. Gewinnung humaner Follikularflüssigkeit

Die Proben humaner Follikularflüssigkeit (hFF) zur Induktion der Akrosomreaktion (AR) wurden bei der Follikel-Aspiration von 4 Patientinnen gesammelt, die an der Universitäts-Frauenklinik Gießen am IVF-Programm teilnahmen.

Zur Beseitigung zellulärer Bestandteile, wurde die Follikularflüssigkeit 10 Minuten bei 400xg und 4°C zentrifugiert. Um eine mögliche Kontamination der Proben mit hämolysiertem Blut oder HTF-Spülmedium (Human Tubal Fluid-Medium; QUINN et al., 1985; wird zum Spülen der Follikel während der Oozyten Entnahme verwendet und enthält 5 IU/ml Heparin (Roche, Basel, Schweiz)) auszuschließen, wurden alle Überstände verworfen, die eine rötliche Färbung aufwiesen. Überstände, welche eine gelbe Färbung erkennen ließen, wurden zur Beseitigung weiterer zellulärer und

ungelöster Bestandteile nochmals 30 Minuten bei 4000xg und 4°C zentrifugiert. Die Proben der vier Patientinnen wurden gepoolt, aliquotiert und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

3.2. In vitro-Fertilisation (IVF-Programm) und Fertilisationsrate

Alle Verfahren der assistierten Reproduktion wurden in der Universitäts-Frauenklinik Gießen von Herrn Prof. Dr. med. H. Gips, Herrn Prof. Dr. med. J. Kleinstein, Herrn Dr. biol. hom. O. Khanaga und Herrn Dipl. Biol. H. Turley durchgeführt.

Die häufigste Indikation zur Durchführung der IVF-Behandlung war der Tubenverschuß oder eine eingeschränkte tubare Funktionsfähigkeit. Andere Indikationen beinhalteten auf der weiblichen Seite die Endometriose, daneben konkrete andrologische Ursachen (ca. 10%) sowie idiopathische Infertilität. Die Stimulationen aller Patientinnen des IVF-Programms wurden nach zwei standardisierten Protokollen durchgeführt. Demgemäß wurden die Ovarien entweder mit humanem menopausalem Gonadotropin (hMG: Humegon, Organon, Oberschleißheim, FRG; bzw. Pergonal, Serono, Unterschleißheim, FRG) oder mit Clomiphencitrat (CC: Pergotime, Serono,) stimuliert. Dies erfolgte in Abhängigkeit der Ansprechbarkeit der Ovarien (Östradiol-Wert im Serum und Anzahl bzw. Größe der Follikel) mit einer täglichen subkutanen Applikation von 2-4 Ampullen hMG á 75 IE. Die ovarielle Stimulation wurde einerseits mittels mehrmaliger Bestimmung der Serumöstradiolkonzentration (E2-Wert) und andererseits durch transvaginale Kontrolle der Follikelanzahl und -größe überwacht. Entsprechend des Gesamtöstradiolwerts im Serum und der berechneten E2-Werte je Follikel sowie der Anzahl und Größe der Follikel wurde die Ovulation mit humanen Choriongonadotropin (hCG, 10000 IE, i.m.) ausgelöst.

Die Oozyten wurden ca. 72 Stunden nach hCG-Injektion durch sonographisch kontrollierte transvaginale Follikelpunktion gewonnen. Danach erfolgte die in vitro-Fertilisation, wie im folgenden kurz beschrieben.

Zum Spülen der Follikel wurde HTF-Spülmedium verwendet, dem 20 mM HEPES (Sigma, St. Louis, USA) und 10% inaktiviertes Patientenserum zugesetzt war. Die Follikelflüssigkeit wurde in einem Gewebekulturröhrchen gesammelt und im IVF-Labor unter dem Mikroskop auf Eizellen kontrolliert. Von den durch Punktion gewonnen Eizellen wurden die drei morphologisch besten ausgewählt und in HTF-

Medium, supplementiert mit 10% Patientenserum ohne HEPES, 3-6 Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre mit 3% CO₂ nachgereift.

Die Spermatozoen wurden mit Standard Swim up-Verfahren aufbereitet. Diese Separationstechnik beruht auf der aktiven Einwanderung von Spermatozoen in ein darübergeschichtetes Medium und wurde wie folgt durchgeführt:

Ein Milliliter verflüssigtes Ejakulat wurde mit 3 ml HTF-Medium (37°C) verdünnt und 10 Minuten bei 400xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet vorsichtig mit 1 ml frischem HTF-Medium überschichtet und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Spermatozoen wandern während dieser Inkubationsphase aktiv in das Medium ein, wobei schlecht bewegliche oder tote Zellen am Gefäßboden zurück bleiben. Nach beendeter Inkubation wurde die obere Schicht, welche die beweglichen Samenzellen enthielt, vorsichtig abpipettiert.

Anschließend wurden die derartig separierten Spermatozoen (etwa 100.000/Oozyte) mit den Oozyten in HTF-Medium 24 Stunden bei 37°C in einer Atmosphäre mit 3% CO₂ inkubiert. Oozyten mit zwei Pronuklei wurden als fertilisiert bezeichnet, die anderen als nicht fertilisiert. Eizellen mit mehr als zwei Vorkernen wurden vom Transfer von vornherein ausgeschlossen. Es wurden etwa 5% Tri- bzw. Polyploidien beobachtet. Fertilisierte, diploide Oozyten wurden den Frauen im Rahmen eines intratubaren Embryotransfer (TEST), Pronucleusstadiumtransfer (PROST) oder intrauterinen Embryotransfer (IVF-ET) übertragen. Beim IVF-ET, der am häufigsten durchgeführten Methode, erfolgte die Übertragung der Embryonen (36-38 Stunden nach Befruchtung) mittels eines dünnen Katheters in den Uterus. Beim PROST oder TEST wurden die befruchteten Eizellen in die Ampulle transferiert. Zuvor wurden die Eizellen ebenso in vitro fertilisiert. Der Transfer erfolgte entweder nach 18-20 Stunden im Pronukleusstadium (PROST) oder nach 50-52 Stunden im frühen Embryonalstadium (Zwei-, Vier- oder Achtzellstadium) (TEST) laparoskopisch.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung (vom Nov. 1990 bis April 1992) durften nach dem deutschen Embryonenschutzgesetz nur drei Oozyten inseminiert werden. Demzufolge konnten nur vier Fertilisationsraten (0%, 33%, 66% und 100%) erhalten werden. Diese wurden mit den verschiedenen Spermatozoenparametern in Beziehung gestellt und die jeweiligen Korrelationen berechnet. Darüber hinaus

wurden, einschließlich der zugehörigen Statistik, diagnostische Vorhersagewerte der einzelnen Spermatozoenfunktionsparameter für die andrologische Diagnostik ermittelt.

3.3. Klassische Spermatozoenparameter des Nativejakulats sowie nach Aufbereitung mit Swim up-Technik

Die Basis der andrologischen Diagnostik stellt die Bestimmung der klassischen Ejakulatparameter dar. Hierzu gehören die Spermatozoenparameter Konzentration, Morphologie und Motilität, einschließlich der progressiven Beweglichkeit.

Die Standardsamenanalyse gibt die Spermatozoenzahl in 10^6 Zellen/ml, den Anteil morphologischer Normalformen sowie die quantitative (% motiler Spermatozoen) als auch qualitative (Score 0-4; bzw. % progressiv motile Spermatozoen) Beweglichkeit an.

Zur Quantifizierung der unterschiedlichen Bewegungsmodalitäten wurde der Score von 0-4 angewendet und damit der vorrangige Motilitätsgrad angegeben:

- | | |
|---|--|
| 0 | keine Motilität |
| 1 | lokale Motilität |
| 2 | langsame, ungerichtete Motilität |
| 3 | schnelle, vorwärts gerichtete Motilität |
| 4 | sehr schnelle, vorwärts gerichtete Motilität mit seitlicher Kopfauslenkung |

Diese Spermatozoenparameter, sowohl im Nativejakulat (n=182) als auch nach Aufbereitung mittels Swim up-Verfahren (n=168), wurden von der IVF-Einheit der Frauenklinik Gießen bestimmt. Eine Swim up-Fraktion wurde im Rahmen der IVF zur Fertilisation der Oozyten eingesetzt. Die einzelnen Werte wurden mit den Fertilisationsraten in vitro korreliert. Desweiteren wurden zur Evaluierung der verschiedenen Parameter die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Ein Kollektiv mit niedriger Fertilisationsrate (0% und 33%) und ein anderes Kollektiv mit hoher Fertilisationsrate (66% und 100%). Hierfür wurden die entsprechenden Vorhersagewerte kalkuliert.

3.4. Motilitätsbestimmung mittels Computergestützter Analyse

Zu einer der häufigsten Ursachen männlicher Infertilität zählt zu geringe Beweglichkeit der Spermatozoen (AITKEN, 1989; TESARIK & TESTART, 1989).

Um ihre Bedeutung für den Fertilisationsprozeß weiter zu untersuchen, wurde dieser Parameter in der vorliegenden Arbeit detaillierter untersucht. Zur objektiven Quantifizierung der Motilität wurde die computer-assistierte Samenanalyse (CASA) eingesetzt. Neben der Erfassung der Motilität, konnten mit dieser Technik auch Bahn- und Geschwindigkeitsparameter der Spermatozoen analysiert werden.

Folgende Parameter der Bewegungsanalyse wurden bestimmt:

1. Immotilität
2. Globalmotilität (mit nachfolgender Unterteilung):
 - a) lokal motile Spermatozoen
 - b) Kreisläufer
 - c) nichtlinear-motile Spermatozoen
 - d) linear-motile Spermatozoen (entsprechend der Progressivmotilität Grad A nach der WHO-Klassifizierung (WHO, 1987))
3. Geschwindigkeitsparameter:
 - a) VSL (straight-line-velocity): „Progressivgeschwindigkeit“ ($\mu\text{m/s}$)
= Geschwindigkeitsverteilung des Weges, der auf einer vom ersten zum letzten Bahnpunkt gedachten Linie liegt.
 - b) VCL (curve-line-velocity): „Spurgeschwindigkeit“ ($\mu\text{m/s}$)
= Geschwindigkeitsverteilung der Vektorbahnen, die aus den Originalbahnpunkten besteht.
 - c) VAP (average-path-velocity): „Pfadgeschwindigkeit“ ($\mu\text{m/s}$)
= Geschwindigkeitsverteilung der gemittelten Bahnen aller Zellen.
4. Bewegungsparameter:
 - a) LIN (Linearität; Quotient aus VSL und VAP)
= Linearitätshistogramm der als geradlinig oder nicht geradlinig eingestuften Spermatozoen.
 - b) LHD (seitliche Kopfauslenkung; lateral head displacement)
= Histogramm der seitlichen Kopfauslenkung der beweglichen Spermatozoen.

Die Grundeinstellungen des Meßgeräts sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Es wurde überprüft, ob ein Zusammenhang der verschiedenen Geschwindigkeitsparameter in Ejakulaten von 82 IVF-Patienten mit den jeweiligen Fertilisationsraten in vitro besteht.

Tabelle 2: Grundeinstellungen für die Computer-gestützte Motilitätsanalyse

FRMAX: 30	Anzahl der Bilder der Sequenz
FRMIN: 15	Anzahl der Bilder, die ein Objekt als Spermatozoon mindestens erkannt haben muß, um gezählt zu werden
TIME: 20	Zeit zwischen zwei Videohalbbildern
AREAMIN: 35	Untere Flächengrenze in Pixel, unter die ein Objekt fallen muß, um in die Auswertung einzugehen
AREAMAX: 350	Obere Flächengrenze in Pixel, unter die ein Objekt fallen muß, um in die Auswertung einzugehen
OBJECTS: light	Durch die Phasenkontrastmikroskopie erscheinen die Objekt heller als der Hintergrund
CLASS: 3	Klasseneinteilung der Geschwindigkeit im numerischen Ergebnis in $\mu\text{m/s}$
IMO: 5	Geschwindigkeitsgrenze für immotile Objekte in $\mu\text{m/s}$
LOC: 15	Geschwindigkeitsgrenze für lokal motile Objekte in $\mu\text{m/s}$
DEPTH 10:	Tiefe der Meßkammer in μm
COLUMNS: 2	Anzahl der zu bearbeitenden, horizontalen Zeilen
PDIST: 31	Kreisradius in Pixel, in dem Teilchen zugeordnet werden
VANISH: 2	Anzahl der Bilder, bei denen ein Spermatozoon weiter berücksichtigt wird, falls es bei einer Drehung bedingt durch die flache Form „untergetaucht“ ist
SELDIR: on	Zur Zuordnung der Teilbahnen wird durch den entsprechenden Algorithmus die Richtung einer Bahn als Bahnparameter untersucht
CORRECT: on	Eine Videokamera liefert Bilder im interlaced-Betrieb, weshalb aufeinanderfolgende Halbbilder in horizontaler Richtung jeweils um eine Zeile verschoben sind. Dies wird bei der Schwerpunktsermittlung korrigiert
TUKEYWIN: 4	Größe des linearen Tukeyfensters, mit dem die Bahnen geglättet werden
TAIL: light	Mustererkennung linienhafter Strukturen an den Kopfenden der Objekte sind heller als der Hintergrund
CALIBRATION: 390	Eichfaktor für das verwendete Kamera-Mikroskopobjekt
SEQMODE: on	Die analysierten Bilder werden vom Sequenzspeicher geladen

Zur Präparation der Spermatozoen wurde das Inkubationsmedium nach BIGGERS, WHITTEN & WHITTINGHAM (1971) (NaCl: 94,7mmol/l; KCl: 4,78mmol/l; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$: 1,71mmol/l; KH_2PO_4 : 1,19mmol/l; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 1,19mmol/l; NaHCO_3 : 25,07mmol/l; Na-Laktat: 21,58mmol/l; Na-Pyruvat: 0,5mmol/l; Glucose: 5,56mmol/l; HEPES: 20mmol/l; pH 7,4), supplementiert mit Streptomycin (25 µg/ml; Calbiochem, Bad Soden/Taunus, FRG) und Penicillin (15 µg/ml; Sigma), verwendet (BWW-Medium). Phenolrot (Merck) diente als pH-Indikator. Für die Inkubation der Spermatozoen wurde dem Medium humanes Serumalbumin zugesetzt (HSA: 5 mg/ml; Behring-Werke, Marburg, FRG) (BWW-HSA-Medium).

Sowohl das native Ejakulat als auch mit BWW-HSA gewaschene Spermatozoen der Patienten wurden in einer Makler-Kammer (Tiefe: 10µm) mit Hilfe der Computer-Video-Mikrographie (Strömberg-Mika Cell Motion Analysis; SM-CMA-Programm, Version 1989; Mika Medical Equipment, Bad Feilnbach, FRG) ausgemessen.

3.5. Beurteilung der Membranintegrität mittels Hypoosmotischem Schwelltest (HOS-Test)

Um die funktionelle Integrität der Spermatozoenmembran zu beurteilen, entwickelten JEYENDRAN et al. (1984) den Hypoosmotischen Schwelltest (HOS-Test). Der Assay basiert auf dem osmotischen Prinzip. Der Flüssigkeitsaustausch an einer intakten Zellmembran erfolgt dabei unter hypoosmotischen Bedingungen solange, bis ein Ausgleich zwischen dem Innen- und Außenraum der Zelle erreicht ist (SONG et al., 1991). Bei vitalen Spermatozoen in einer hypoosmolaren Lösung können so charakteristische Schwellungsphänome hauptsächlich im Bereich des Flagellums im Phasenkontrast beobachtet werden.

Als hypoosmotisches Medium wurde eine Lösung, die zu 50% aus D-Fructose (13,75 g / 500 ml A. bidest., 150 mOsmol/kg; reinst, Merck, Darmstadt, FRG) und zu weiteren 50% aus tri-Natriumcitrat-Dihydrat z.A. (7,35 g/500 ml A. bidest., 150 mOsmol/kg; Merck) bestand, verwendet. Dieser Puffer wurde zu je 1,0 ml portioniert und die Aliquots bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C eingefroren.

Einhundert µl des verflüssigten Ejakulates wurden 1:10 mit dem hypoosmolaren Puffer verdünnt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 10 Minuten

bei 400xg zentrifugiert, dreiviertel des Übestandes abgenommen und das Pellet in dem verbleibenden Rest resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 20 µl auf einem Objektträger ausgestrichen und 200 Spermatozoen im Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung nach dem in Abbildung 4 angegebenen Schema ausgewertet.

Dabei wurden die sichtbaren morphologischen Veränderungen der Zellmembran der Spermatozoenflagellen in Anlehnung an JEYENDRAN et al. (1984) in Gruppen verschiedener Typen (A-G) eingeteilt. Der Anteil geschwollener Spermatozoen ergab sich aus den Typ-Gruppen B-G. Der Anteil geschwollener G-Typ Spermatozoen wurde gesondert berechnet, da dieser, wie bei TAKAHASHI et al. (1990), als Fertilitätsindex zu bewerten sein soll.

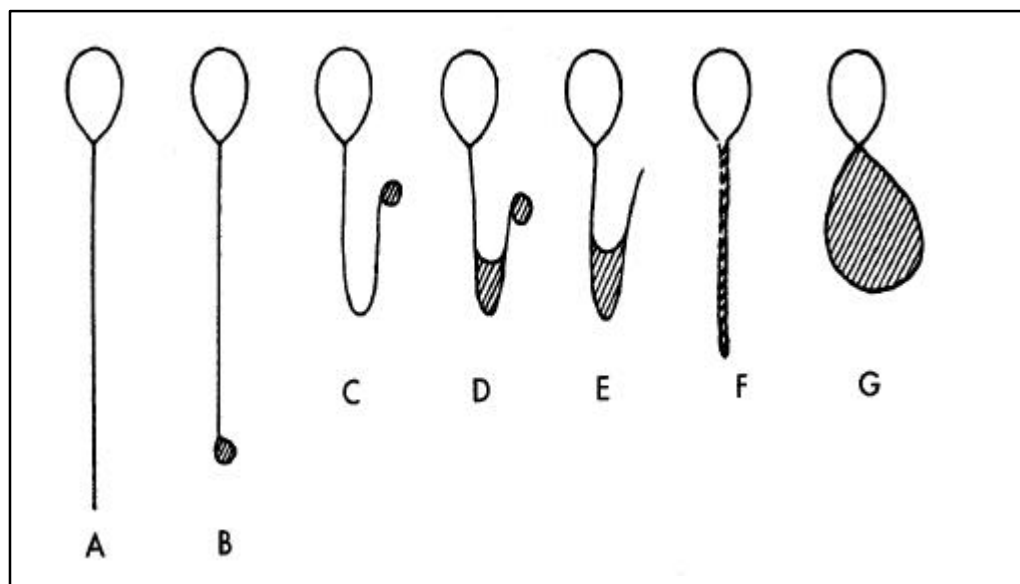


Abbildung 4: Schematische Darstellung der typischen morphologischen Veränderungen der Flagellen menschlicher Spermatozoen in hypoosmotischem Medium (JEYENDRAN et al., 1984). Schraffierte Bereiche kennzeichnen die Schwellung.

(A), keine Flagellumschwellung

(B) - (G), verschiedene Schwellungsphänomene des Flagellums, die während der Inkubation in dem hypoosmotischen Medium auftreten.

(modifiziert nach LIPSHULTZ et al., 1997)

Bei Aliquots von 55 Ejakulaten, welche auch für die in vitro-Fertilisation verwendet wurden, wurde der Anteil geschwollener Flagellen (Typ B-G) und gesondert der Anteil G-Typ Flagellen zur Fertilisationsrate in vitro korreliert. Zur Evaluierung des HOS-Tests in der andrologischen Routinediagnostik und zur Berechnung von Vorhersagewerten wurden die Patienten zusätzlich in eine Gruppe mit geringer (0% und 33%) und eine mit guter Fertilisation (66% und 100%) eingeteilt. Eine zweite Unterteilung erfolgte in fertile (FR: 33%, 66%, 100%) und infertile (FR: 0%) Patienten.

3.6. Bestimmung der Akrosomreaktion (AR)

Um den Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen in den Proben zu bestimmen, wurde die Triple-Stain Methode nach TALBOT & CHACON (1981) angewendet. Diese hat gegenüber anderen Methoden den Vorteil, daß in den Proben einerseits zwischen lebenden und toten Spermatozoen differenziert werden kann und andererseits die Präparate nach der Fixierung eingedeckelt und gelagert werden können. Somit stehen die Präparate für spätere Auswertungen und Untersuchungen zur Verfügung.

In dieser Arbeit sollte zum einen die physikalische Induktion der AR mittels Niedrigtemperatur als auch die physiologische Induktion mit Follikularflüssigkeit untersucht und verglichen werden. Desweiteren wurden die Spontane AR (Kontrollwert), die Induzierte AR (Testwert) sowie die Induzierbarkeit der AR (= Differenz zwischen Induzierter AR und Spontaner AR) mit den jeweiligen Fertilisationsraten korreliert. Zur Evaluierung des Assays wurden die Patienten in Gruppen mit einer Fertilisationsrate <50% und >50% unterteilt und Vorhersagewerte berechnet.

3.6.1. Nicht-physiologische Induktion der Akrosomreaktion mit Niedrigtemperatur

Zur Evaluierung und Etablierung einer klinisch verwertbaren Methode zur Induktion der Akrosomreaktion wurde die physikalische Induktion mittels Niedrigtemperatur (SÁNCHEZ et al., 1991) verwendet. Diese Methode ist im Gegensatz zur Stimulation mit Calcium-Ionophor A23187, einer Substanz, welche häufig zur Induktion der Akrosomreaktion eingesetzt wird, primär nicht toxisch. Der Vorteil dieser Methode

gegenüber der physiologischen Stimulation mit Zona pellucida oder humaner Follikularflüssigkeit liegt in der Standardisierbarkeit und besseren Verfügbarkeit.

Da sich im Seminalplasma Faktoren befinden, die sowohl die Kapazitation als auch die akrosomale Reaktion hemmen, muß zunächst das Seminalplasma eliminiert werden. Diesbezüglich wurden die Ejakulatproben mit BWW-HSA-Medium im Verhältnis 1:4 verdünnt. Dabei wurden zu 500 µl der jeweiligen Ejakulatprobe 1,5 ml Medium gegeben, bei 400xg 10 Minuten zentrifugiert und anschließend in 500 µl BWW-HSA resuspendiert. Anschließend wurden von der Spermatozoensuspension zwei Aliquots zu je 250 µl abgenommen. Eines wurde zur Ermittlung des Kontrollwertes (spontane Akrosomreaktion) sofort drei Stunden bei 37°C inkubiert. Während dieses Zeitraums findet die Kapazitation statt.

Der Testwert (Induzierte Akrosomreaktion) wurde nach Induktion der AR für 16 Stunden bei 4°C im Kühlschrank und anschließender dreistündiger Kapazitation bei 37°C bestimmt.

3.6.2. Physiologische Induktion der Akrosomreaktion durch humane Follikularflüssigkeit

Um die Induktion der Induzierbarkeit der AR durch einen physiologischen Induktor, humane Follikularflüssigkeit (hFF), mit dem physikalischen Induktor (Niedrigtemperatur) zu vergleichen, wurde bei 18 Patienten, deren Frauen im IVF-Programm waren, die Akrosomreaktion mit beiden Methoden induziert.

Sechshundert µl Ejakulat wurden mit BWW-HSA im Verhältnis 1:4 verdünnt und die Spermatozoen gewaschen. Anschließend wurde mit 600 µl frischem BWW-HSA resuspendiert und die Probe auf drei Zentrifugenröhrchen (à 200 µl) aufgeteilt. Mit dem Kontrollwert und dem Testwert bei Niedrigtemperatur wurde wie unter 3.6.1 beschrieben verfahren. Für die Induktion der Akrosomreaktion mit humaner Follikularflüssigkeit (hFF) wurde die Spermatozoensuspension 3 Stunden bei 37°C kapazitiert. Nach Waschen der Spermatozoen bei 400xg für 5 Minuten wurde das Pellet in BWW-HSA-Medium, das 20% hFF enthielt, resuspendiert. Zur Induktion der Akrosomreaktion wurde die Zellsuspension für weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert, danach mit BWW-HSA-Medium nochmals 1:5 verdünnt, 10 Minuten bei 400xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachfolgend wurde mittels Triple-Stain

(TALBOT & CHACON, 1981) gefärbt. Der Anteil lebend akrosom-reagierter Spermatozoen nach der Induktion sowie die Induzierbarkeit wurden jeweils mit den zugehörigen Daten nach Induktion mit Niedrigtemperatur korreliert.

3.6.3. Triple-Stain Technik

Bei der Triple-Stain Technik (TALBOT & CHACON, 1981) werden die Spermatozoen mit drei verschiedenen Farbstoffen gefärbt, um zwischen akrosom-reagierten und nicht-akrosom-reagierten sowie zwischen lebenden und toten Spermatozoen zu differenzieren.

Im Anschluß an den Kapazitationsschritt wurden 250 µl der Spermatozoensuspension mit 200 µl Trypanblau (Sigma) (2% in BWW) versetzt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert (Vitalfärbung). Anschließend wurde mit 3 ml BWW (ohne HSA) gewaschen und 10 Minuten bei 400xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl Glutaraldehyd (Merck) (3% in BWW) resuspendiert und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Spermatozoensuspension mit 2 ml BWW verdünnt und 10 Minuten bei 400xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mehrmals mit der Pipette aufgezogen und 20 µl der Suspension auf einem entfetteten Objektträger ausgestrichen. Der Ausstrich wurde luftgetrocknet. Anschließend wurden die Objektträger 5 Minuten bei 40°C in 0,8% Bismarckbraun (Sigma) in A.dest., pH 1,8 (eingestellt mit 0,1 M HCl) gefärbt. Nach dreimaligem kurzen Waschen in A. bidest. wurde 40 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,8% Rosé Bengal (Sigma) in 0,1 M Tris-HCl, pH 5,6, gefärbt. Danach wurden die Ausstriche nochmals dreimal in destilliertem Wasser gewaschen, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96% Ethanol) und Xylol (Merck) dehydratisiert und mit Eukitt (Kindler, Freiburg, FRG) eingedeckelt. Nachdem sich das Einschlußmittel verfestigt hatte, wurden die Objektträger bei 1000-facher Vergrößerung mit Öl-Immersion (Merck) im Hellfeldmikroskop (Orthoplan; Leitz, Wetzlar, FRG) nach folgendem Schema ausgewertet. Es wurden jeweils 400 morphologisch normale Spermatozoen in zufällig gewählten Gesichtsfeldern ausgezählt. Der Anteil der lebend reagierten Spermatozoen wurde prozentual zur Gesamtzahl aller lebenden Zellen angegeben.

Für die Beurteilung der AR wurden vier verschiedene Anfärbungen unterschieden (siehe Abb. 5):

1. Tote Spermatozoen mit intaktem Akrosom sind postakrosomal graubraun bis schwarz angefärbt, das Akrosom zeigt eine kräftig rosa Färbung.
2. Tote, degenerativ akrosom-reagierte Spermatozoen färben sich postakrosomal graubraun bis schwarz, während die akrosomale Region hellrosa bis weiß erscheint.
3. Vitale, nicht reagierte Spermatozoen weisen postakrosomal eine hellbraune und akrosomal eine rosa Färbung auf.
4. Vitale, akrosom-reagierte Spermatozoen sind postakrosomal hellbraun angefärbt und zeigen in der akrosomalen Region eine hellrosa bis weiße Färbung.

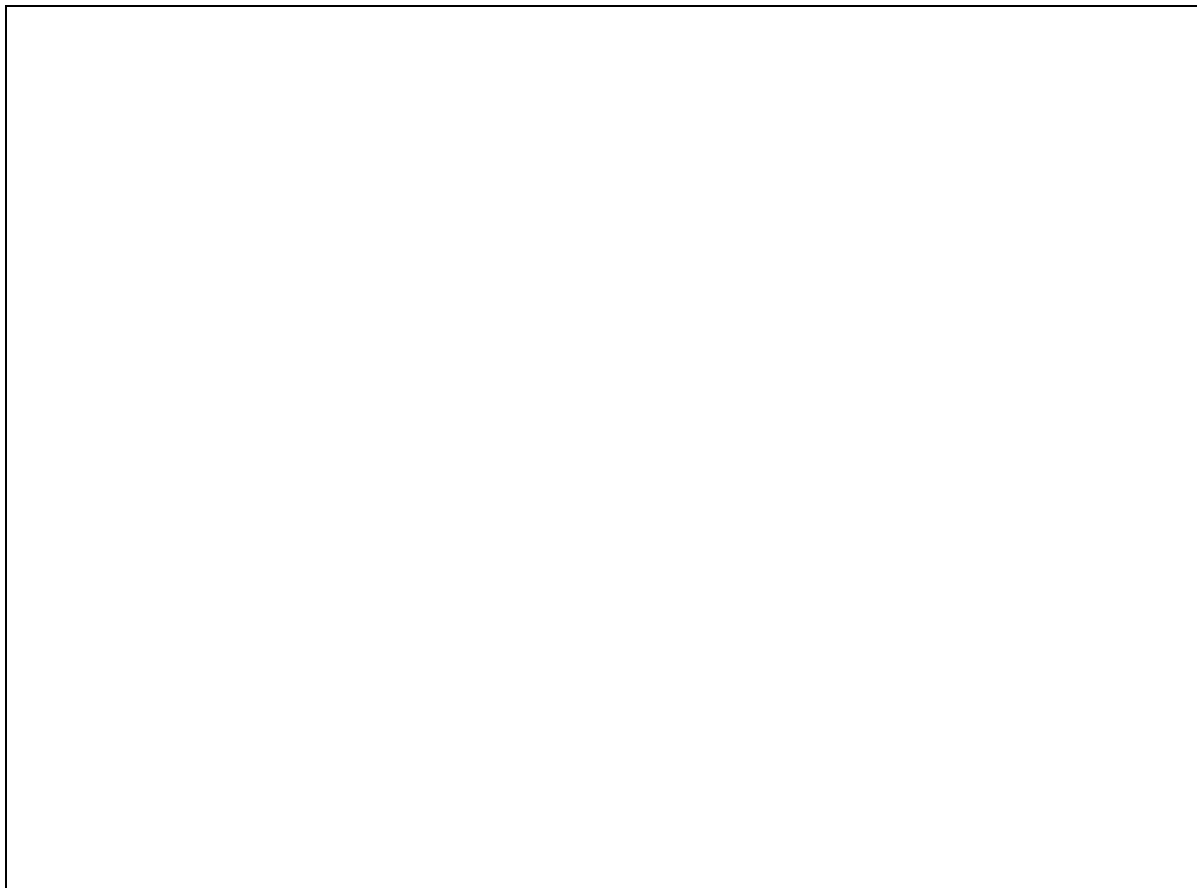


Abbildung 5: Mikroskopische Darstellung humaner Spermatozoen nach Behandlung mit Triple-Stain Technik (Hellfeldmikroskop; 1000fache Vergrößerung; Ölimmersion). Eine postakrosomal hellbraune Anfärbung kennzeichnet lebende, eine dunkelbraune bis schwarze Färbung tote Spermatozoen; erscheint das Akrosom hellrosa bis weiß, handelt es sich um reagierte Zellen, wogegen eine rosa Färbung auf ein intaktes Akrosom hinweist.

lr: lebend reagiert; **ln:** lebend nicht reagiert; **tr:** tot reagiert

3.7. Akrosinaktivität

Das Spermatozoenakrosom enthält eine Vielzahl Enzyme, die für eine erfolgreiche Fertilisation notwendig sind. Dabei wird dem Akrosin, einer trypsinähnlichen Serinproteinase (STAMBAUGH & BUCKLEY, 1970; STAMBAUGH, 1976; SRIVASTAVA et al., 1979), eine Schlüsselrolle bei der Zonabindung und -penetration zugeschrieben (SCHILL et al., 1988).

Bisher wurde eine Reihe verschiedener Methoden zur Bestimmung der Akrosinaktivität entwickelt. Diese beruhen zum einen prinzipiell auf der proteolytischen, esterolytischen und aminolytischen Aktivität des Enzyms sowie auf der Interaktion mit Anti-Akrosin-Antikörpern (MÜLLER-ESTERL & FRITZ, 1981; PLEBAN et al., 1990).

Zwei dieser Testverfahren sind die Spektralphotometrie (SCHILL, 1973; POLAKOSKI et al., 1977; KENNEDY et al., 1989) und die Gelatinolysetechnik, welche erstmals von GADDUM & BLANDAU (1970) beschrieben und 1988 von WELKER et al. als Testsystem für menschliche Spermatozoen eingeführt wurde.

3.7.1. Bestimmung der Akrosinaktivität mittels Gelatinolysetechnik

Die Gelatinolysetechnik nach WELKER et al. (1988) ermöglicht die Beurteilung der proteolytischen Aktivität des Akrosins auf gelatine-beschichteten Objektträgern. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit optimiert. Dabei werden Spermatozoen auf einem mit Gelatine beschichteten Objektträger ausgestrichen und in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Akrosin lysiert die Gelatine und es bilden sich um die Spermatozoenköpfe herum Lysishöfe (Halos) aus. Dies erfolgt durch Depolymerisation der Gelatine (GADDUM & BLANDAU, 1970). Die Halos sind im Phasenkontrast deutlich als helle Bereiche zu erkennen, deren Durchmesser mit einem Objektmikrometer ausgemessen werden kann und der Akrosinaktivität entspricht. Der prozentuale Anteil der Spermatozoen, welcher Halobildung aufweist, wird als Haloformationsrate bezeichnet. Sowohl der durchschnittliche Halodurchmesser, die Haloformationsrate, als auch der Akrosinaktivitäts Index, der aus Halodurchmesser und Haloformationsrate berechnet wird, wurden mit der Fertilisationsrate in vitro korreliert.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs der Akrosinaktivität in menschlichen Spermatozoen und der Fertilisation in vitro wurden Aliquots von 114 Ejakulaten eingesetzt, die auch für die in vitro-Fertilisation in der Frauenklinik Gießen verwendet wurden (Normozoospermie, n=96; Asthenozoospermie, n=12; Oligozoospermie, n=10; Polyzoospermie, n=2). Bei Auswertung der Routinespermiogrammparametern lag die Spermatozoendichte bei 56×10^6 Zellen/ml ($\pm 2,8$), die Gesamtzahl morphologischer Normalformen bei 55% ($\pm 0,7$) und die Gesamtmotilität bei 45% ($\pm 0,7$).

Bei 45 Patienten wurde der Standard-Gelatinolyse Assay mit der photometrischen Bestimmung der Akrosinaktivität verglichen.

3.7.1.1. Herstellung Gelatine-beschichteter Objektträger

Beschichtung:

Die Gelatine-beschichteten Objektträger wurden wie folgt hergestellt:

Einhundert mg Gelatine (Merck, Gelatine für die Mikrobiologie: #4070) wurden bei 56°C in 2 ml A. bidest. gelöst. Anschließend wurden 40 µl dieser Gelatinelösung luftblasenfrei auf einen gesäuberten Objektträger gegeben, ein zweiter Objektträger auf den ersten gelegt und der Tropfen luftblasen-frei zwischen beiden Objektträgern verteilt. Danach wurden beide Objektträger horizontal auseinander gezogen, mit der beschichteten Seite nach oben kurz angetrocknet (nicht vollständig trocken) und 24 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4°C waagrecht gelagert.

Fixierung:

Am nächsten Tag wurden die Objektträger zwei Minuten in 0,05% Glutaraldehyd (Merck) in Phosphat-Puffer (NaCl: 34,22 mmol/l; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$: 7,86 mmol/l; KH_2PO_4 : 0,17 mmol/l, pH 7,8) fixiert, zweimal 15 Sekunden in dem Phosphat-Puffer und anschließend 20 Sekunden in A. bidest. gewaschen. Die fixierten Objektträger konnten bei 4°C in einer feuchten Kammer bis zu 3 Wochen aufbewahrt werden.

3.7.1.2. Testdurchführung

Einhundert μl Ejakulat wurden 1:10 (bei Patienten mit Normo- oder Polyzoospermie; Zelldichte $> 20 \times 10^6$ Zellen/ml) bzw. 1:5 (bei Patienten mit Oligozoospermie; Zelldichte $< 20 \times 10^6$ Zellen/ml) mit einem Phosphat-Puffer (NaCl: 34,22 mmol/l; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$: 20,8 mmol/l; KH_2PO_4 : 1,42 mmol/l; α -D-Glucose: 15,72 mmol/l, die Osmolarität wurde auf 280 mOsmol/kg eingestellt) (HENKEL et al., 1995) verdünnt und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden 20 μl der Spermatozoensuspension auf die vorbereiteten Gelatine-beschichteten Objektträger ausgestrichen, kurz angetrocknet (nicht vollständig trocken) und zwei Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Auswertung erfolgte im Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung (Abb. 6: Schematische Darstellung der Gelatinolysetechnik). Dabei wurde der Durchmesser der Lysishöfe von 10 Spermatozoen (WELKER et al., 1988) mit einem Objektmikrometer gemessen und daraus der Mittelwert errechnet. Desweiteren wurde die Haloformationsrate in % (Anteil der Spermatozoen, die einen Halo ausgebildet haben) durch Auszählen von 100 Spermatozoen bestimmt. Der Akrosinaktivitäts Index wurde berechnet, indem der Halodurchmesser mit der Haloformationsrate multipliziert und anschließend durch hundert dividiert wurde. Diese Werte wurden mit den entsprechenden Fertilisationsraten in vitro (0%, 33%, 66% und 100%) korreliert. Darüber hinaus wurden Vorhersagewerte sowie Spezifität und Sensitivität des Assays mittels ROC-Kurven Analyse berechnet.

3.7.1.3. Modifikationen der Gelatinolysetechnik

Um eine gleichmäßigere Verteilung der Halos auf den Gelatine-beschichteten Objektträgern zu erhalten und damit die Auswertung zu erleichtern, wurde der Versuchsansatz folgendermaßen modifiziert:

Alternativmethode 1:

Zur Eliminierung von Akrosininhibitoren aus dem Seminalplasma, wurden 100 μl Ejakulat 1:10 mit Phosphat-Puffer (s.o.; 3.7.1.2.) verdünnt und 6 Minuten bei 400xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 μl frischem

Phosphat-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde wie unter 3.7.1.2. beschrieben weiterverfahren.

Alternativmethode 2:

Zur Beschichtung der Objektträger wurden anstatt 40 µl Gelatinelösung 60 µl luftblasen-frei auf einen gereinigten Objektträger gegeben und dieser Tropfen zwischen zwei Objektträgern durch horizontales Auseinanderziehen gleichmäßig verteilt. Weiter wurde wie unter 3.7.1.1. und 3.7.1.2. verfahren.

Alternativmethode 3:

In einem dritten Versuchsansatz wurde sowohl zentrifugiert (1), als auch die dickere Gelatine-Beschichtung verwendet (2). Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 3.7.1.2..

Zum Vergleich dieser Modifikationen mit der Standardmethode wurde jeweils mit zwei Ansätzen gearbeitet. Der Kontrollansatz nach der Standard-Methode wurde jeweils mit den Testansätzen 1, 2 oder 3 korreliert. Darüber hinaus wurde die Alternativmethode 3 mit der Fertilisationsrate in vitro korreliert.

In diesem Teil der Arbeit wurden Aliquots von 118 Ejakulaten aus der Andrologischen Sprechstunde der Hautklinik, als auch 50 Ejakulate aus dem IVF-Programm eingesetzt.

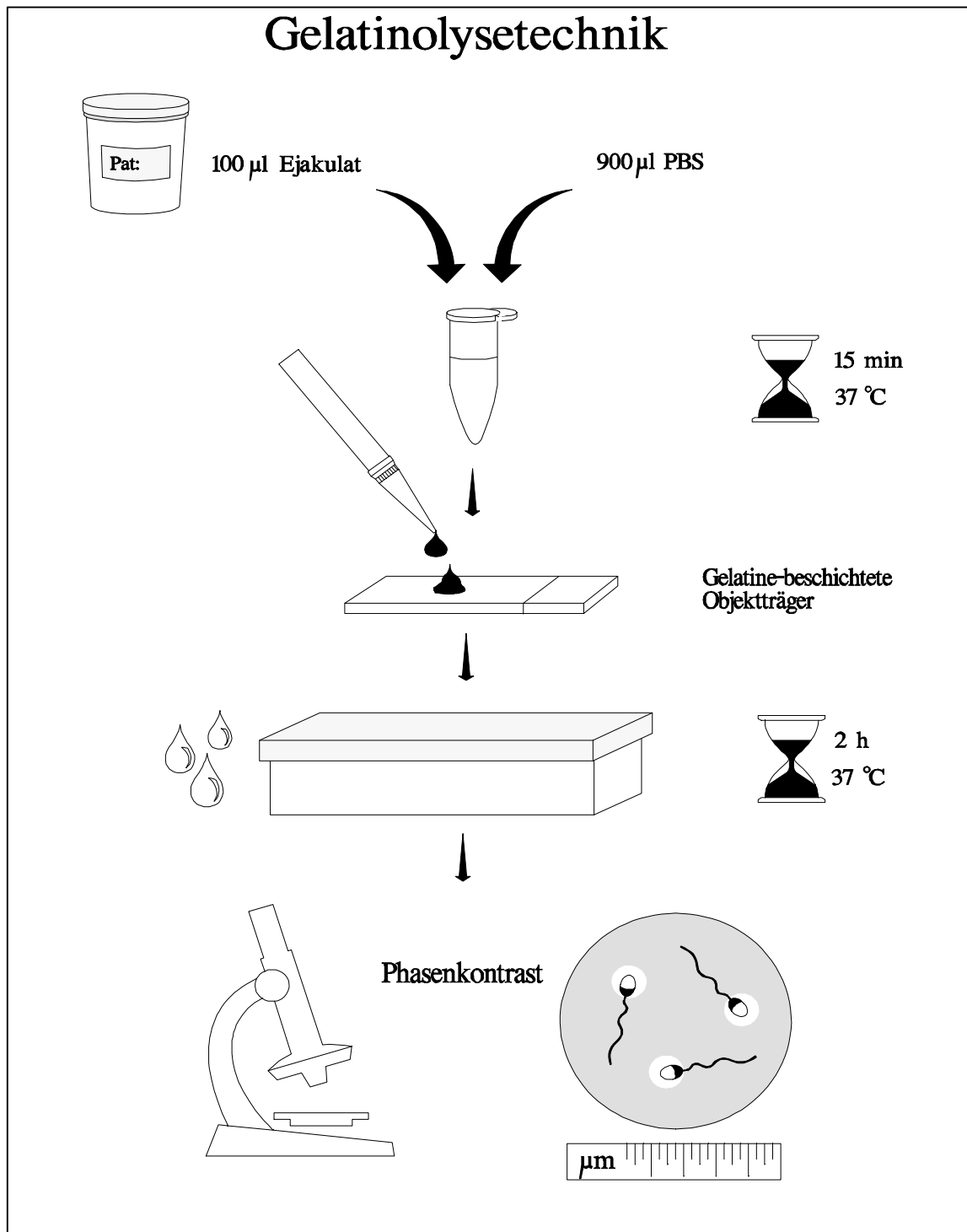


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Gelatinolysetechnik:

Die Ejakulatprobe wird 1:10 (bzw. 1:5) mit Phosphatpuffer versetzt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Von dieser Spermatozoensuspension werden 20 µl auf einem Gelatine-beschichteten Objektträger ausgestrichen und in einer feuchten Kammer 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Halos um die einzelnen Spermatozoenköpfe, können mit einem Mikrometer im Phasenkontrast ausgemessen werden.

3.7.2. Photometrische Bestimmung der Akrosinaktivität

Der von SCHILL (1990) beschriebene Test zur Bestimmung der Gesamtakrosinaktivität beruht auf der essigsäuren Extraktion (pH 2,4) gewaschener Spermatozoen (SCHILL, 1973) nach Freisetzung des Akrosins durch Aufbrechen der akrosomalen Membranen in flüssigem Stickstoff (SCHILL et al., 1982). Die esterolytische Aktivität der Proteinase kann anschließend spektralphotometrisch mittels Hydrolyse des Benzoyl-arginin-ethylesters (BAEE), einem niedermolekularem Substrat, und eines weiteren Detektionssystems (Alkoholdehydrogenase, ADH) gemessen werden. Nach dieser Methode kann die enzymatische Akrosinaktivität sowohl im Spermatozoenpellet (Sediment) als auch -überstand (Suspension) bestimmt werden. Der Vorteil einer getrennten Akrosinaktivitätsbestimmung von Überstand und Pellet besteht in der Information über die Stabilität der akrosomalen Membran und der Fähigkeit des Akrosoms Akrosin freizusetzen.

3.7.2.1. *Extraktion von Akrosin*

Aliquots von 200 µl menschlichem Ejakulat wurden 10 Minuten bei 600xg und 4°C zentrifugiert. Zur separaten Aktivitätsbestimmung des Akrosins im Überstand wurde dieser abgehoben und eingefroren (Akrosin-Überstand-Aktivität). Um Akrosininhibitoren zu entfernen, wurde das Pellet zweimal mit 200 µl 0,9% NaCl gewaschen (10 Minuten, 600xg, 4°C) und anschließend mindestens 24 Stunden bei -20°C eingefroren (Akrosin-Pellet-Aktivität). Das hatte den Vorteil, daß Proben mehrerer Patienten über mehrere Tage gesammelt und gemeinsam gemessen werden konnten. Die Proben wurden bei 37°C aufgetaut. Das Pellet wurde in 200 µl 0,9% NaCl resuspendiert. Resuspendiertes Pellet und Überstand wurden dann in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren, was eine vollständige Extraktion des Akrosins zur Folge hat. Nach Auftauen bei 37°C im Wasserbad (ca. 15 Minuten), wurde zu jeder Probe 200 µl 2%-ige Essigsäure (Fluka, Buchs, Schweiz) zugegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Hierbei (pH Wert: 2,0-2,7) erfolgt die vollständige Dissoziation des Enzyms vom Akrosininhibitor-komplex, so daß eine inhibitorfreie Bestimmung des aktiven Akrosins in seiner stabilisierten Form erfolgen kann. Anschließend wurden die Proben nochmals 5 Minuten bei 600xg und 4°C

zentrifugiert und der Überstand (= Säureextrakt) in den im folgenden beschriebenen BAEE/ADH-Testansatz eingebracht und gemessen.

3.7.2.2. *Enzymatischer Assay (BAEE/ADH-Nachweis)*

Im nächsten Schritt erfolgte nach Autoaktivierung von Proakrosin zum aktiven Akrosin die Messung der Akrosinaktivität (Säureextrakt) mittels Spektralphotometer bei neutralem pH-Wert (p=8,0).

Die benötigten Puffer und Reagenziengemische setzten sich wie folgt zusammen:

Puffer : 15,2 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ z.A. (Merck)
 4,1 g Semicarbazidhydrochlorid z.A. (Merck)
 0,9 g Glycine (analytical grade) (Serva, Heidelberg, FRG)
 ad 500 ml A. bidest.
 eingestellt auf pH 8,7 (mit 2N NaOH (Merck))
 (bei 4°C 2 Wochen stabil)

N α -Benzoyl-L-Arginin-ethylester hydrochlorid (BAEE):

Lösen von 10 mg BAEE (Merck) in 10 ml A. bidest.
 (Zubereitung jedesmal frisch im Eisbad)

Alkoholdehydrogenase (ADH):

Lösen von 100 mg ADH (Fluka) in 3,4 ml 3,2 mol/l Ammoniumsulfat z.A. (Serva)
 →spez. Aktivität 200 U/mg ; pH 6,0
 (bei 4°C stabil)

β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (freie Säure) (NAD⁺):

Lösen von 20 mg NAD (Merck) in 1 ml A. bidest.
 (bei 4°C mehrere Tage stabil)

Um die Kinetik der Enzymreaktion zu bestimmen, wurde unter standardisierten Bedingungen mit einem Spektralphotometer (Beckmann Photometer, DU-68

Spektrophotometer, Beckmann Instruments, Irvine, USA) bei einer Wellenlänge von 366 nm und 25°C gemessen.

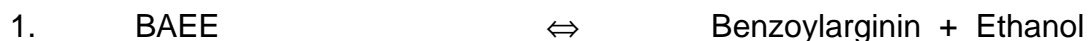
Vor Beginn der enzymatischen Reaktion wurde die Pufferlösung auf 25°C erwärmt und folgende Lösungen wurden in die temperierten Makroküvetten pipetiert und gemischt:

- 1) 0,1 ml NAD-Lösung
- 2) 2,35 ml Puffer
- 3) 0,5 ml BAEE-Lösung
- 4) 0,02 ml ADH-Lösung

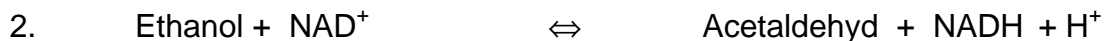
Die Küvette wurde zunächst 5 Minuten bei 25°C vorinkubiert. Anschließend wurde der Leerwert durch Zugabe von 0,05 ml 2%-Essigsäure bestimmt. Danach wurde jeweils 0,05 ml des essigsauren akrosomalen Extrakts (jeweils von Pellet und Überstand der gleichen Ejakulatprobe) (Testwerte) in die einzelnen Küvetten zugegeben, vorsichtig gemischt und die Extinktion gemessen. Dabei wurden über einen Zeitraum von 10 Minuten Einminutenwerte der Extinktion aufgezeichnet.

Bei diesem BAEE/ADH-Nachweis handelt es sich um zwei Reaktionsschritte:

Akrosin



ADH



Zuerst erfolgt die Hydrolyse des trypsinspezifischen Substrats BAEE, welches bei pH 8,0 nur von Akrosin gespalten wird. Diese Reaktion wird anschließend mit dem ADH/NAD⁺-Indikator-System detektiert. Über die Extinktionsänderung (E) des gebildeten NADH₂ kann die Akrosinaktivität in mU/ml nach folgender Formel berechnet werden :

E/Minute	x 20 = mU/ml
0,011	

Dabei entspricht 1 mU Akrosinaktivität der Hydrolyse von 1 nM BAEE in einer Minute bei pH 8,0 und 25°C.

Nach Division dieses Werts durch die Spermatozoenanzahl, kann die Akrosinaktivität in $mU/10^6$ Spermatozoen umgerechnet werden.

Somit konnten die einzelnen Extinktionswerte jeweils von Pellet (Akrosinaktivität Pellet) und Überstand (Akrosinaktivität Überstand) getrennt, als auch addiert (Akrosinaktivität Pellet+Überstand), bezogen auf 10^6 Spermatozoen, errechnet werden.

Von 50 Ejakulataliquots, die auch für die IVF eingesetzt wurden, wurden die ermittelten Akrosinaktivitäten in $mU/10^6$ Spermatozoen (Pellet, Überstand und Pellet + Überstand) mit den entsprechenden Fertilisationsraten in vitro (0%, 33%, 66% und 100%) korreliert. Um die photometrische Akrosinmessung mit dem Gelatinolyse Assay (3.7.1) zu vergleichen, wurde bei 44 Patienten dieser Zusammenhang statistisch überprüft.

3.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Wistat PC (WisoSoft, Marburg, FRG) sowie mit MedCalc V. 2.20, MedCalc Software (Mariakerke, Belgien). Die Berechnung der Werte im H-Test und SJ-Test wurde von Herrn W. Pabst (Institut für Medizinische Informatik, JLU Gießen) durchgeführt.

Aus den Einzeldaten der Untersuchungsergebnisse wurden Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (\pm SEM) berechnet. Auch wurden Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Spermatozoen-Parameter untereinander bestimmt.

Zur Klärung der Frage nach signifikanten Unterschieden innerhalb der einzelnen Gruppen wurden folgende, nicht parametrische Tests durchgeführt:

- H-Test nach Kruskal-Wallis
- SJ-Test nach Jonckheere
- Wilcoxon-Test
- U-Test von Mann-Whitney

Zum späteren Einsatz in der andrologischen Diagnostik wurde für einzelne Spermatozoenfunktionsparameter eine ROC-Kurven Analyse zur Berechnung von Sensitivität, Spezifität, negativem und positivem Vorhersagewert durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

Die entscheidende Frage der vorliegenden Arbeit war, ob ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Spermatozoenparametern und der Fertilisationsrate in vitro im Rahmen des IVF-Programmes der Universitätsfrauenklinik Gießen bestand und wie dieser Zusammenhang charakterisiert ist. Dazu sollten für die einzelnen Spermatozoenparameter Vorhersagewerte zum Einsatz in der andrologischen Diagnostik ermittelt werden.

Zunächst wurden Korrelationen zwischen den klassischen Spermatozonparametern Zelldichte, Morphologie und Motilität, einschließlich der Progressivmotilität sowie computergestützter Motilitätsbestimmung, und der Fertilisationsrate in vitro bestimmt. Anhand der so gewonnenen Daten wurden die Normalwerte dieser Parameter sowie statistische Werte der Assays (Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert) mit der Fertilisation als Kriterium mittels ROC-Kurven Analyse berechnet.

4.1.1. Spermiogrammwerte des Nativejakulats sowie nach Aufbereitung mit Swim up-Technik und Fertilisationsrate

Die klassischen Spermiogrammparameter (Spermatozoendichte, -morphologie, -motilität und Progressivmotilität) des Nativejakulats und nach Aufbereitung mittels Swim up wurden mit der Fertilisationsrate in vitro korreliert. Der Mittelwert (\pm SEM) für die Spermatozoendichte im Ejakulat betrug $72,4 \times 10^6/\text{ml}$ ($\pm 4,03$), für den Anteil morphologisch normal geformter Spermatozoen 54,1% ($\pm 0,07\%$) und für die Gesamtmotilität 53,0% ($\pm 1,21\%$). Nach Aufbereitung der Ejakulate mittels Swim up ergaben sich folgende Werte: $7,5 \times 10^6/\text{ml}$ ($\pm 0,53$) Spermatozoen, 56,1% ($\pm 1,02\%$) morphologische Normalformen und eine Gesamtmotilität von 84,5% ($\pm 0,74\%$). Diese Werte (\pm SEM) sind in Tabelle 3 nochmals zusammengestellt.

Tabelle 3: Mittelwerte (\pm SEM) von Spermatozoendichte (10^6 Zellen/ml), morphologischen Normalformen (%), Gesamtmotilität (%) und Progressivmotilität (Score 0-4) des Nativejakulats (n=182) sowie nach Aufbereitung mittels Swim up-Verfahren (n=168).

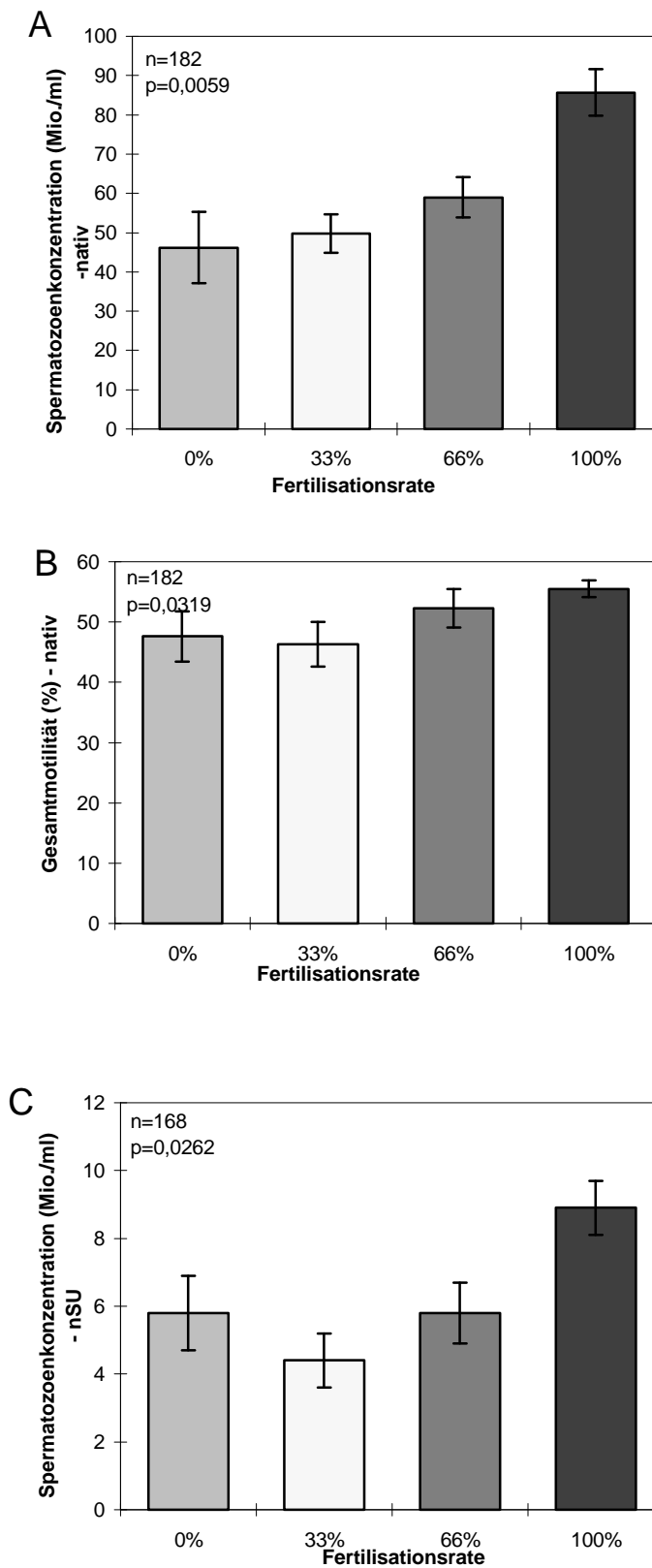
	Nativejakulat (n=182)		nach Swim up-Verfahren (n=168)	
	x	\pm SEM	x	\pm SEM
Spermatozoendichte (10^6 Sp./ml)	72,4	4,03	7,5	0,53
Morphologische Normalformen (%)	54,1	0,07	56,1	1,02
Gesamtmotilität (%)	53,0	1,21	84,5	0,74
Progressivmotilität (0-4)	2,9	0,04	3,4	0,02

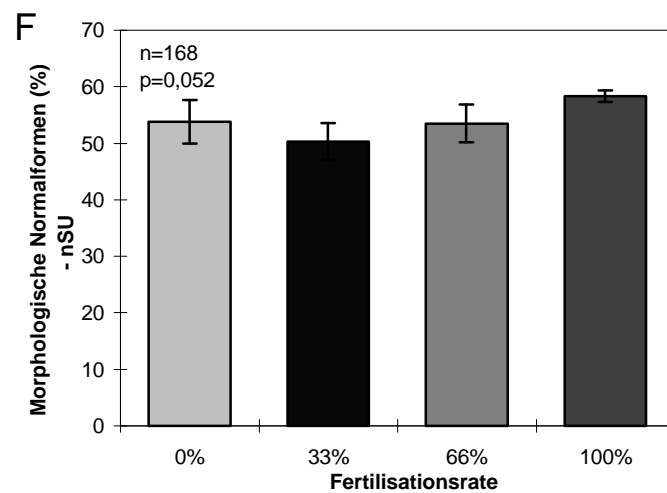
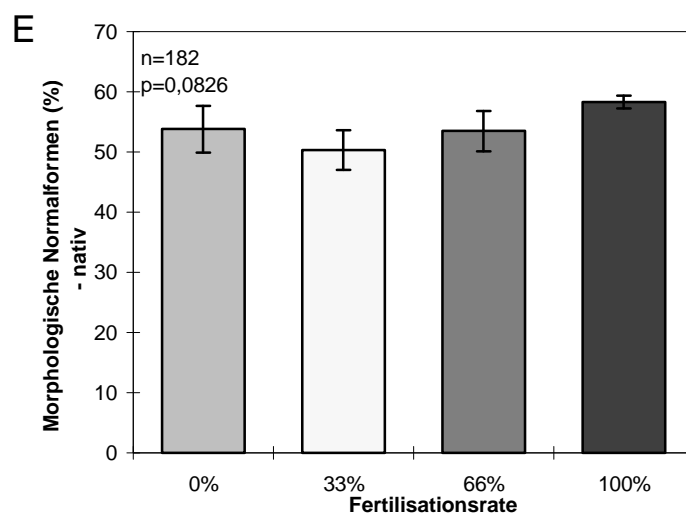
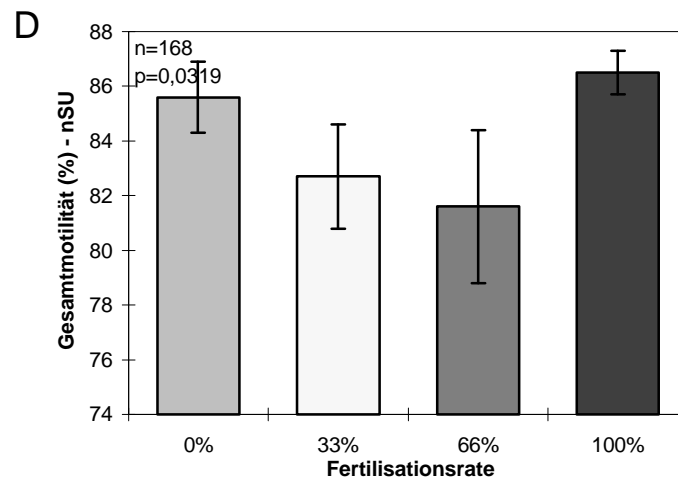
Diese Einzelparameter wurden mit der Fertilisationsrate korreliert und die Signifikanz mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis getestet. Dabei ergaben sich die folgenden, in Tabelle 4 aufgeführten Korrelationskoeffizienten und Irrtumswahrscheinlichkeiten.

Tabelle 4: Zusammenhang verschiedener Spermatozoenparameter mit der Fertilisationsrate in vitro vor (nativ) und nach Swim up-Verfahren (n. SU). Statistische Auswertung mittels H-Test nach Kruskal Wallis. Übersicht über die einzelnen Korrelationskoeffizienten (r) und Irrtumswahrscheinlichkeiten (P); - = nicht signifikant; + = signifikant; ++ = hochsignifikant.

	Korrelationskoeffizient (r)		Irrtumswahrscheinlichkeit (P) (H-Test)		Signifikanz	
	NATIV	n. SU	NATIV	n. SU	NATIV	n. SU
Spermatozoendichte ($\times 10^6$ Sp./ml)	0,374	0,316	0,0057	0,0262	++	+
Morphologie (%)	0,293	0,285	0,0826	0,0520	-	-
Gesamtmotilität (%)	0,301	0,276	0,0319	0,0319	+	+
Progressivmotilität (0-4)	0,308	0,526	0,0900	0,3920	-	-

Bei Aufteilung der Patienten anhand der Fertilisationsraten in zwei Gruppen lagen 44 Männer in der Gruppe mit einer Fertilisationsrate $<50\%$ und 138 in der mit einer Fertilisationsrate $>50\%$. Nach Aufbereitung gehörten 36 Männer dem Kollektiv mit Fertilisationsraten $<50\%$ und 132 dem mit Fertilisationsraten $>50\%$ an. Dabei ergaben nach Berechnung der Spezifität, Sensitivität sowie des positiven und negativen Vorhersagewerts mittels ROC-Kurven Analyse die Grenzwerte im Nativejakulat für die Spermatozoendichte $70 \times 10^6/\text{ml}$, für den Anteil morphologisch normalgeformter Gameten 50% , für die Gesamtmotilität 60% und für die Progressivmotilität $>2,5$. Die entsprechenden Werte nach Aufbereitung waren $6,4 \times 10^6/\text{ml}$, 55% , 88% und >3 . Diese statistischen Daten, auch für die entsprechenden Grenzwerte nach Swim up-Verfahren, sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Auffallend ist die hohe Spezifität bei niedriger Sensitivität für Spermatozoendichte (Spezifität: $81,8\%$; Sensitivität: $45,6\%$) und Gesamtmotilität (Spezifität: $84,1\%$; Sensitivität: $40,6\%$) im Nativejakulat. Nach Swim up sind diese Vorhersagewerte insgesamt geringer, nur die Progressivmotilität weist bei Überschreiten eines Scors von 3, was kennzeichnend für eine schnelle und progressive Motilität ist, eine hohe Sensitivität ($89,3\%$) bei niedriger Spezifität ($19,1\%$) auf. Auch der relativ hohe Korrelationskoeffizient ($r=0,526$) unterstreicht diesen Zusammenhang. In Abbildung 7 (A-H) sind die jeweiligen Parameter Spermatozenkonzentration, Anteil morphologischer Normalformen, Gesamtmotilität und Progressivmotilität des Nativejakulats (A, B, E, G) und nach Aufbereitung mittels Swim up-Technik (C, D, F, H) zu den Fertilisationsraten 0% , 33% , 66% und 100% in Beziehung gestellt. Auffallend ist, daß sich insbesondere in Abbildungen 7 B, C, E und F bei einer Fertilisationsrate von 33% ein Minimum des jeweiligen Parameters zeigt.





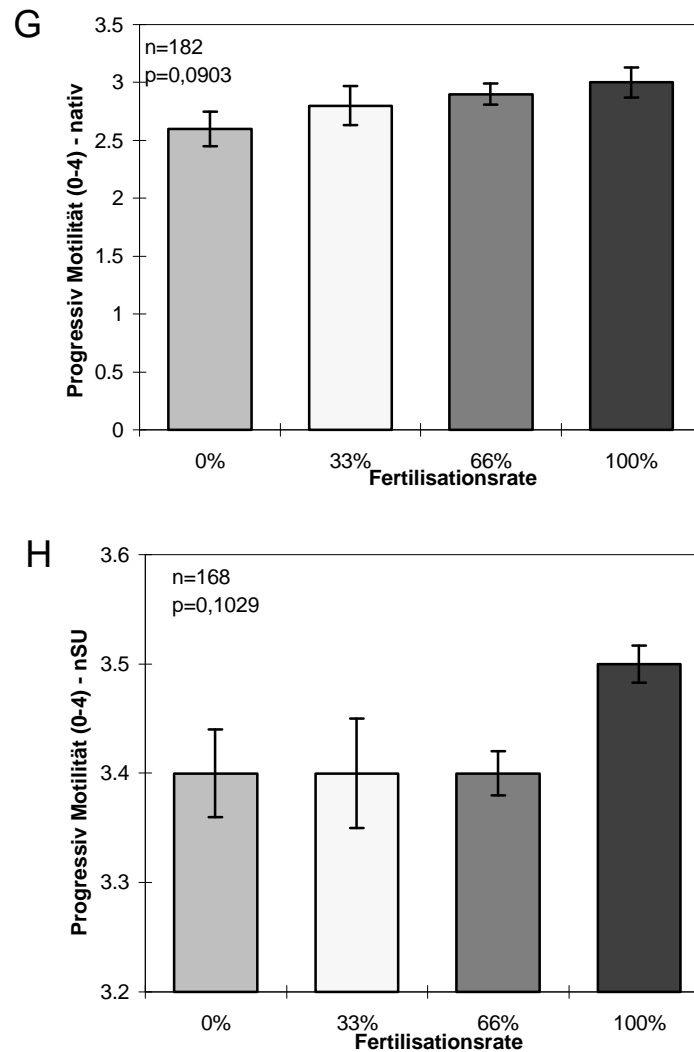


Abbildung 7: Korrelation von mittlerer Spermatozoenkonzentration (\pm SEM) vor (A) und nach Aufbereitung mit Swim up (C) sowie der Gesamtmotilität in (\pm SEM) vor (B) und nach Swim up (D) mit der Fertilisation in vitro. Für alle vier Parameter zeigte sich im H-Test nach Kruskal-Wallis ein signifikanter Zusammenhang (A: $P=0,0058$, $r=0,374$; B: $P=0,0319$, $r=0,301$; C: $P=0,0262$, $r=0,316$; D: $P=0,0319$, $r=0,276$). Für den Anteil morphologischer Normalformen (E, F) und die Progressivmotilität (G, H), sowohl des Nativejakulats als auch nach Swim up, ergab sich kein signifikanter Zusammenhang mit der Fertilisationsrate in vitro (E: $P=0,0826$, $r=0,293$; F: $P=0,052$, $r=0,285$; G: $P=0,090$, $r=0,308$; H: $P=0,103$, $r=0,526$). Insbesondere in B,C,E,F zeigt sich bei einer FR von 33% ein Minimum des jeweiligen Parameters.

Tabelle 5: Statistische Werte der Spermiogrammbefunde (Spermatozoendichte, Morphologie, Gesamtmotilität, Progressivmotilität) des Nativejakulats (A) sowie nach Aufbereitung mit Swim up-Verfahren (B) für die einzelnen Grenzwerte der unterschiedlichen Parameter. Die Grenzwerte wurden unter Anwendung der ROC-Kurven Analyse mit der Fertilisationsrate als Parameter errechnet.

A

<u>NATIVEJAKULAT:</u>	Spermatozoen- dichte > 70×10^6 /ml	Morph. Normal- formen > 50 %	Gesamt- motilität > 60%	Progressiv- motilität > 2,5
Spezifität (%)	81,8	52,3	84,1	56,8
Sensitivität (%)	45,6	73,9	40,6	65,2
Positiver Vorhersagewert (%)	88,7	82,9	88,9	82,2
Negativer Vorhersagewert (%)	32,4	39,0	31,1	34,7

B

nach <u>SWIM UP:</u>	Spermatozoen- dichte > $6,4 \times 10^6$ /ml	Morph. Normal- formen > 50 %	Gesamt- motilität > 88 %	Progressiv- motilität > 3
Spezifität (%)	75,0	52,3	58,3	19,4
Sensitivität (%)	46,2	73,9	51,5	89,3
Positiver Vorhersagewert (%)	87,1	82,9	81,9	80,1
Negativer Vorhersagewert (%)	27,6	39,0	24,7	33,3

Nach Berechnung einer multiplen Regression der aufgeführten Parameter des Nativejakulats, zeigte sich bei Kombination aller Parameter ein hochsignifikanter Zusammenhang mit der Fertilisationsrate in vitro ($P < 0,0001$). Hierbei wies die Spermatozoenkonzentration die beste Korrelation auf ($P = 0,0018$; $r = 0,298$), gefolgt von der Progressivmotilität ($P = 0,0884$; $r = 0,222$), der Gesamtmotilität ($P = 0,3047$; $r = 0,216$) und dem Anteil morphologisch normal geformter Spermatozoen ($P = 0,3830$; $r = 0,231$). Für die Morphologie, Gesamtmotilität und Progressivmotilität ist der Zusammenhang nicht signifikant. Bei Kombination dieser Parameter nach

Aufbereitung des Ejakulats mittels Swim up und Berechnung deren Korrelation mit der Fertilisationsrate, zeigte sich ein deutlich geringerer Zusammenhang ($P=0,019$). Erneut ergab sich bei der Berechnung der multiplen Regression für die Spermatozoendichte die beste Korrelation ($P=0,0464$; $r=0,223$). Im Gegensatz zum Nativejakulat wies die Morphologie die zweitbeste Korrelation auf ($P=0,1470$; $r=0,196$), welche das Signifikanzniveau jedoch nicht erreichte. Zusammenfassend sind die entsprechenden Daten in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Multiple Regression von Spermatozoendichte, Morphologie, Gesamtmotilität, Progressivmotilität des Nativejakulats und nach Aufbereitung mit Swim up mit der Fertilisationsrate in vitro.

	Nativejakulat		nach Aufbereitung mit SU	
	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)	Korrelationskoeffizient (r)	Irrtumswahrscheinlichkeit (P)	Korrelationskoeffizient (r)
Sp.-Konz.(10⁶/ml)	0,0018	0,298	0,0464	0,223
Morphologie (%)	0,3830	0,231	0,1470	0,196
Gesamtmotilität (%)	0,3047	0,216	0,8402	0,060
Prog. Mot. (0-4)	0,0884	0,222	0,3645	0,141

4.1.2. Computergestützte Motilitätsbestimmung

Die computergestützte Motilitätsmessung humaner Spermatozoen wurde an 82 Proben im Nativejakulat und an gewaschenen Spermatozoen durchgeführt. Lediglich bei der LHD (Lateral Head Displacement) und VAP (Average-Path-Velocity=mittlere Pfadgeschwindigkeit) des Nativejakulats konnte eine geringe, aber signifikante Korrelation mit der Fertilisationsrate festgestellt werden. Die mittels H-Test berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit lag für die LHD bei $P=0,013$ ($r=0,27$) und für die VAP bei $P=0,045$ ($r=0,22$) (Abb. 8).

Alle anderen untersuchten Parameter (VSL, VCL, LIN) zeigten keinen signifikanten Zusammenhang.

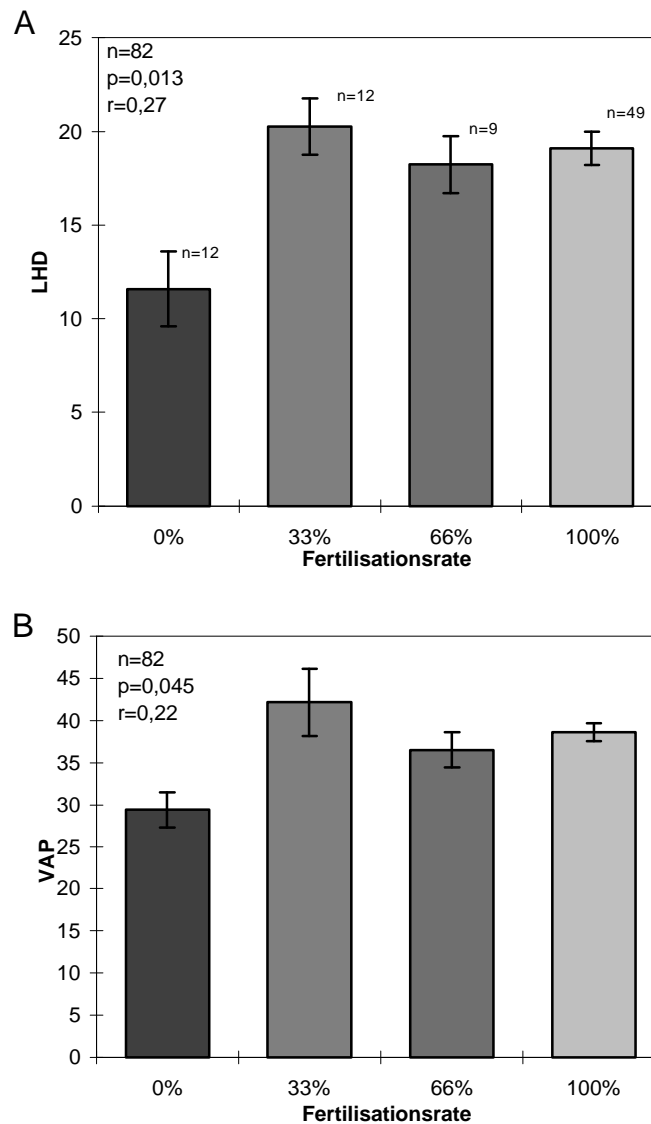


Abbildung 8: Korrelation der Motilitätsparameter Lateral Head Displacement (LHD) (A) und Average Path Velocity (VAP) (B) mit der Fertilisation *in vitro*. Beide Parameter zeigen einen signifikanten Zusammenhang mit der Fertilisationsrate ($P=0,013$; $P=0,045$).

4.2. Hypoosmotischer Schwelltest

Entsprechend des Schwellungsvermögens der Spermatozoen in hypoosmotischem Medium wurden die Spermatozoen in die Typ-Gruppen unterteilt (s. 3.5., Abb. 4). In Abbildung 9 sind die verschiedenen Schwellungsphänomene der Flagellen (A-G) im Phasenkontrast dargestellt. Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Anteil der G-Typ Spermatozoen und dem Gesamtanteil der B-G-Typ Spermatozoen besteht, wurden beide Gruppen miteinander korreliert.

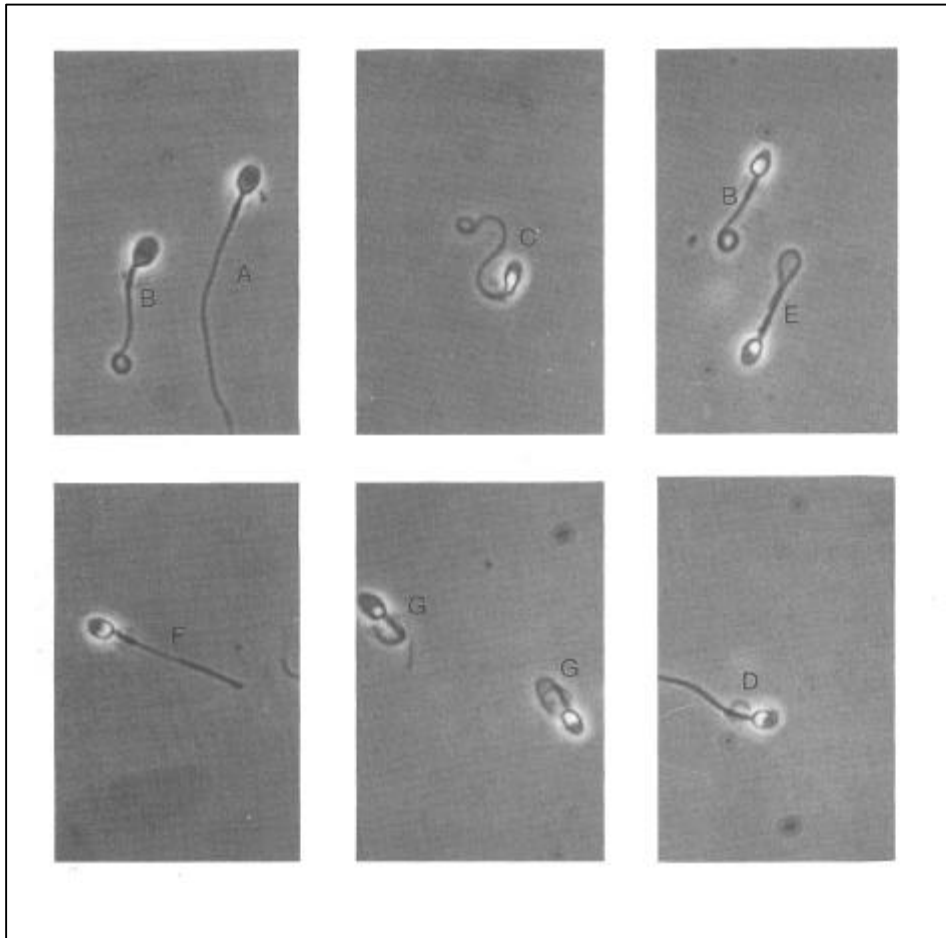


Abbildung 9: Verschiedene Schwellungsphänomene (A-G) der Flagellen humaner Spermatozoen in hypoosmotischem Medium (Phasenkontrast).

A: Spermatozoen ohne Veränderung; B-G: Spermatozoen mit verschiedenen Schwellungsphänomenen.

(modifiziert nach ACOSTA & KRUGER, 1996).

Bei dieser Untersuchung wurden 55 Ejakulatproben von Patienten untersucht, deren Ehefrauen im IVF-Programm teilnahmen. Die Spermigrammauswertungen nach WHO-Kriterien ergaben: 33 Normozoospermie, 5 Asthenozoospermie, 10 Asthenoteratozoospermie, 2 Oligozoospermie, 2 Oligoteratozoospermie und 3 Oligoasthenoteratozoospermie. Die jeweiligen Mittelwerte (\pm SEM) für Spermatozoendichte, morphologische Normalformen und Gesamtmotilität aller eingesetzten Ejakulatproben betrugen $68,4 \times 10^6/\text{ml}$ ($\pm 7,1$), 50,1% ($\pm 0,5\%$) und 50,6% ($\pm 2,5\%$). Zwischen dem Anteil der G-Typ und dem Anteil der B-G-Typ Spermatozoen im Ejakulat wurde eine hochsignifikante Korrelation ($r=0,67$; $P<0,0001$) festgestellt (Abb. 10).

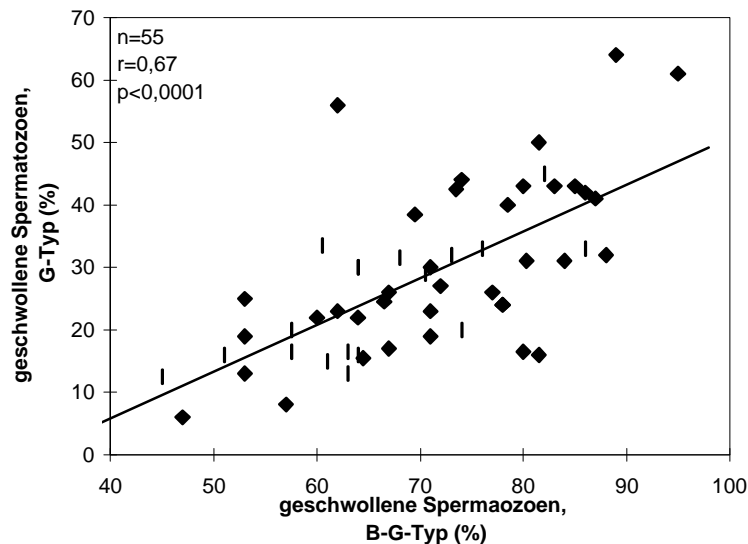
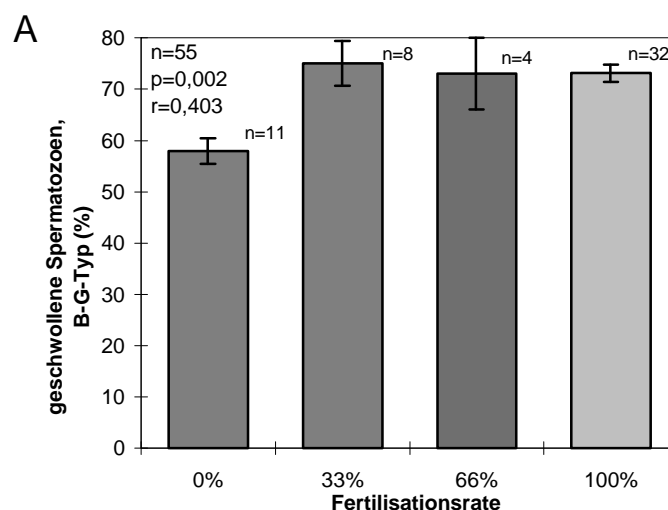


Abbildung 10: Korrelation zwischen dem Anteil B-G-Typ geschwollener Spermatozoen und G-Typ geschwollener Spermatozoen ($r=0,67$, $P<0,0001$).

Abbildung 11 zeigt den Zusammenhang zwischen dem Anteil der B-G-Typ Spermatozoen und der Fertilisationsrate. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Fertilisationsraten hinsichtlich der B-G-Typ und G-Typ Spermatozoen. Dabei ist die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit P für die Gesamtzahl geschwollener Spermatozoen kleiner (H-Test: $P=0,0023$) als für die G-Typ Spermatozoen (H-Test: $P=0,0187$). Für die B-G-Typ Spermatozoen wurde ein etwas höherer Korrelationskoeffizient ($r=0,403$) als für die G-Typ-Spermatozoen ($r=0,317$) ermittelt. Auffallend war der relativ starke Anstieg des Anteils geschwollener B-G- sowie G-Typ Spermatozoen zwischen den Fertilisationsraten 0% und 33%.



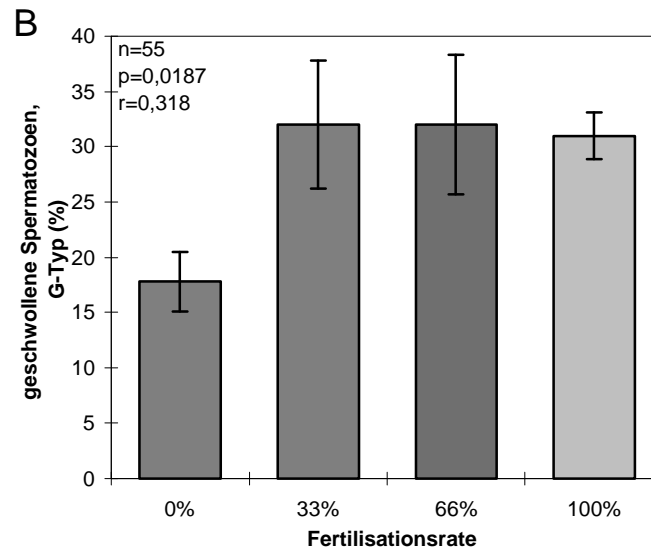


Abbildung 11: Korrelation des Anteils B-G-Typ geschwollener Spermatozoen (A) und der G-Typ Spermatozoen (B) mit der Fertilisationsrate in vitro. Beide Parameter zeigen einen signifikanten Zusammenhang mit der Fertilisation in vitro (A: $P=0,002$, $r=0,403$; B: $P=0,0187$, $r=0,318$). Auffallend ist der starke Anstieg des Anteils geschwollener Spermatozoen zwischen 0% FR und 33% FR.

Wegen des relativ starken Anstiegs geschwollener Spermatozoen zwischen den Fertilisationsraten 0% und 33%, erfolgte eine weitere Unterteilung der Patienten in zwei Gruppen. Um zu überprüfen, ob dieser Anstieg statistisch signifikant ist, wurde entsprechend zwischen infertilen Patienten (Fertilisationsrate: 0%) und fertilen Patienten (Fertilisationsraten: 33%, 66% und 100%) differenziert. Die beiden Patientenkollektive unterschieden sich unter Anwendung des nicht-parametrischen U-Tests nach Mann-Whitney hochsignifikant hinsichtlich beider Parameter. Für die B-G-Typ Spermatozoen lag die Irrtumswahrscheinlichkeit bei $P<0,0001$ und für die G-Typ Spermatozoen betrug sie $P=0,0008$. In Abbildung 12 sind die Mittelwerte (\pm SEM) für die B-G-Typ und G-Typ Spermatozoen mit 58% ($\pm 2,5$) und 18,1% ($\pm 2,7$) für das Patientenkollektiv mit der Fertilisationsrate 0% dargestellt. Die entsprechenden Werte für die fertilen Patienten (Fertilisationsraten: 33%, 66% und 100%) liegen bei 74% ($\pm 1,5$) bzw. 31,2% ($\pm 1,9$).

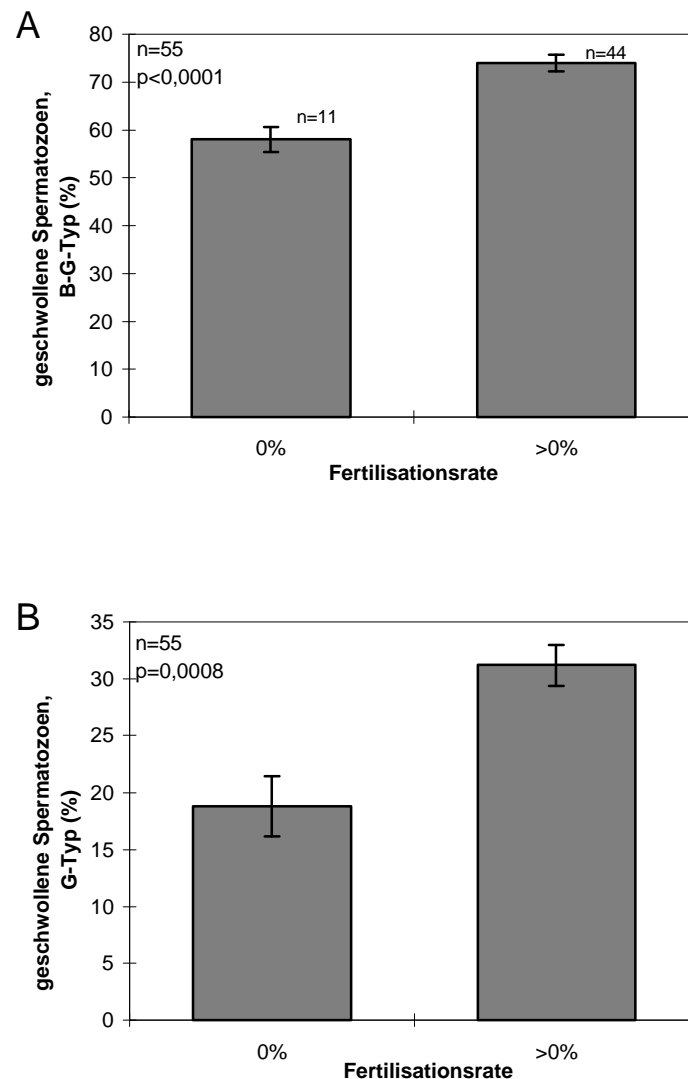


Abbildung 12: Korrelation der B-G-Typ Spermatozoen (A) und der G-Typ Spermatozoen (B) mit der Fertilisationsrate nach Aufteilen der Patienten in infertil (Fertilisationsrate: 0%) und fertil (Fertilisationsraten: 33%, 66% und 100%). In beiden Parametern unterscheiden sich die Patienten hinsichtlich der Fertilisation signifikant ($P<0,0001$; $P=0,008$).

Wurde lediglich zwischen Patienten mit hoher (>50%) und niedriger (<50%) Fertilisationsrate unterschieden, war der Unterschied zwischen diesen beiden Kollektiven hinsichtlich des Anteils geschwollener Spermatozoen (B-G- und G-Typ; $P=0,0173$ und $P=0,014$) nicht so deutlich wie bei der Differenzierung zwischen infertil und fertil. Die Mittelwerte (\pm SEM) für den Anteil B-G-Typ geschwollener Spermatozoen für die Fertilisationsraten 0% und 33% ergaben 65% ($\pm 3,1$) und 73%

($\pm 1,6$) für die Fertilisationsraten 66% und 100%. Die entsprechenden Werte für die G-Typ Spermatozoen waren 24% ($\pm 3,2$) bzw. 31% ($\pm 1,8$) (Abb. 13).

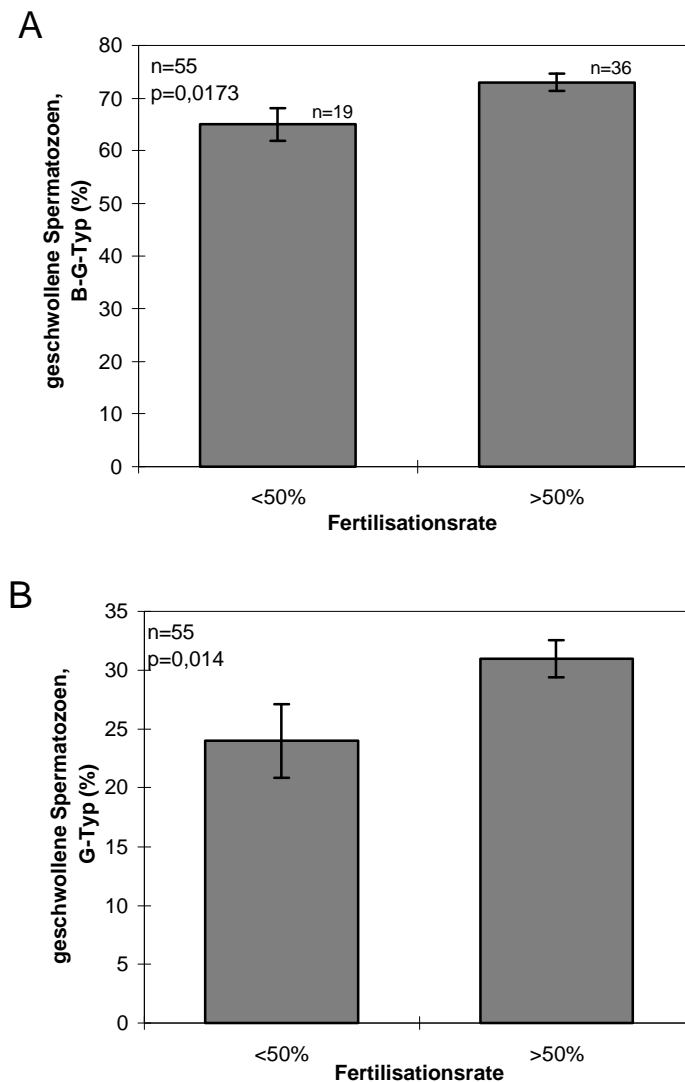


Abbildung 13: Vergleich des Anteils von B-G-Typ Spermatozoen (A) und G-Typ Spermatozoen (B) bei Patienten mit Fertilisationsraten <50% (FR: 0% und 33%) und >50% (FR: 66% und 100%). Beide Patientengruppen unterscheiden sich signifikant ($P=0,0173$, $P=0,014$).

Bei der Evaluierung des Assays wurden die Patienten in die zwei Gruppen, mit hoher (>50%) und niedriger (<50%) Fertilisationsrate, eingeteilt. Die Berechnung der Spezifität, Sensitivität sowie von positivem und negativem Vorhersagewert mittels ROC-Kurven Analyse ergab, daß die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Fertilisation bei weniger als 63% B-G-Typ Spermatozoen bzw. weniger als 19% G-

Typ Spermatozoen deutlich absank. Für diese Grenzwerte ergab sich eine hohe Sensitivität (83,3%) bei relativ niedriger Spezifität (52,6%). Setzte man die entsprechenden Grenzwerte bei der Differenzierung zwischen „fertilen“ und „infertilen“ Patienten ein, ergab sich für die B-G-Typ Spermatozoen eine Spezifität und ein positiver Vorhersagewert von 100% bei relativ niedriger Sensitivität (56,8%) und niedrigem negativem Vorhersagewert (36,7%). Für die G-Typ Spermatozoen wurde ein hoher positiver Vorhersagewert (92,3%) bei relativ hoher Spezifität (72,7%) und Sensitivität (81,8%) berechnet. Die entsprechenden statistischen Daten sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tabelle 7: Statistische Werte des HOS-Tests für B-G-Typ Spermatozoen bei einem Grenzwert von 63% sowie für G-Typ Spermatozoen bei einem Grenzwert von 19%. Die Grenzwerte wurden mittels ROC-Kurven Analyse mit der Fertilisationsrate als Parameter berechnet. Die Differenzierung erfolgte zum einen in Patienten mit einer Fertilisationsrate >50% und <50% (Spalten 1, 2) und zum anderen in „fertile“ (FR: 33%, 66%, 100%) und „infertile“ (FR: 0%) Patienten (Spalten 3, 4).

	<u>1</u> B-G-Typ Spermatozoen (63%)	<u>2</u> G-Typ Spermatozoen (19%)	<u>3</u> B-G-Typ Spermatozoen (63%)	<u>4</u> G-Typ Spermatozoen (19%)
Spezifität (%)	52,6	52,6	100,0	72,7
Sensitivität (%)	83,3	83,3	65,8	81,8
Positiver Vorhersagewert (%)	76,9	76,9	100,0	92,3
Negativer Vorhersagewert (%)	62,5	62,5	36,7	50,0

In Abbildung 14 wurde der Anteil B-G-Typ Spermatozoen (A) und G-Typ Spermatozoen (B) zur Anzahl der Patienten korreliert. Die kumulative Verteilung der Patienten mit einer Fertilisationsrate >50%, wies einen glockenförmigen Verlauf mit einem Maximum zwischen 60% und 80% für B-G-Typ Spermatozoen (A) und zwischen 30% bis 50% für G-Typ Spermatozoen (B) auf. Die Patientengruppe mit einer Fertilisationsrate <50% zeigte dagegen eine deutliche Linksverschiebung der Verteilungskurve. Die niedrigsten Werte fanden sich ausschließlich bei diesen Patienten. Lag der Anteil B-G-Typ Spermatozoen unter 50% bzw. unter 10% für G-Typ Spermatozoen, konnten keine Patienten mit einer Fertilisationsrate über 50%

beobachtet werden. Bei genauerer Analyse waren die Ejakulate dieser Patienten nicht in der Lage die Eizellen zu fertilisieren (FR=0%).

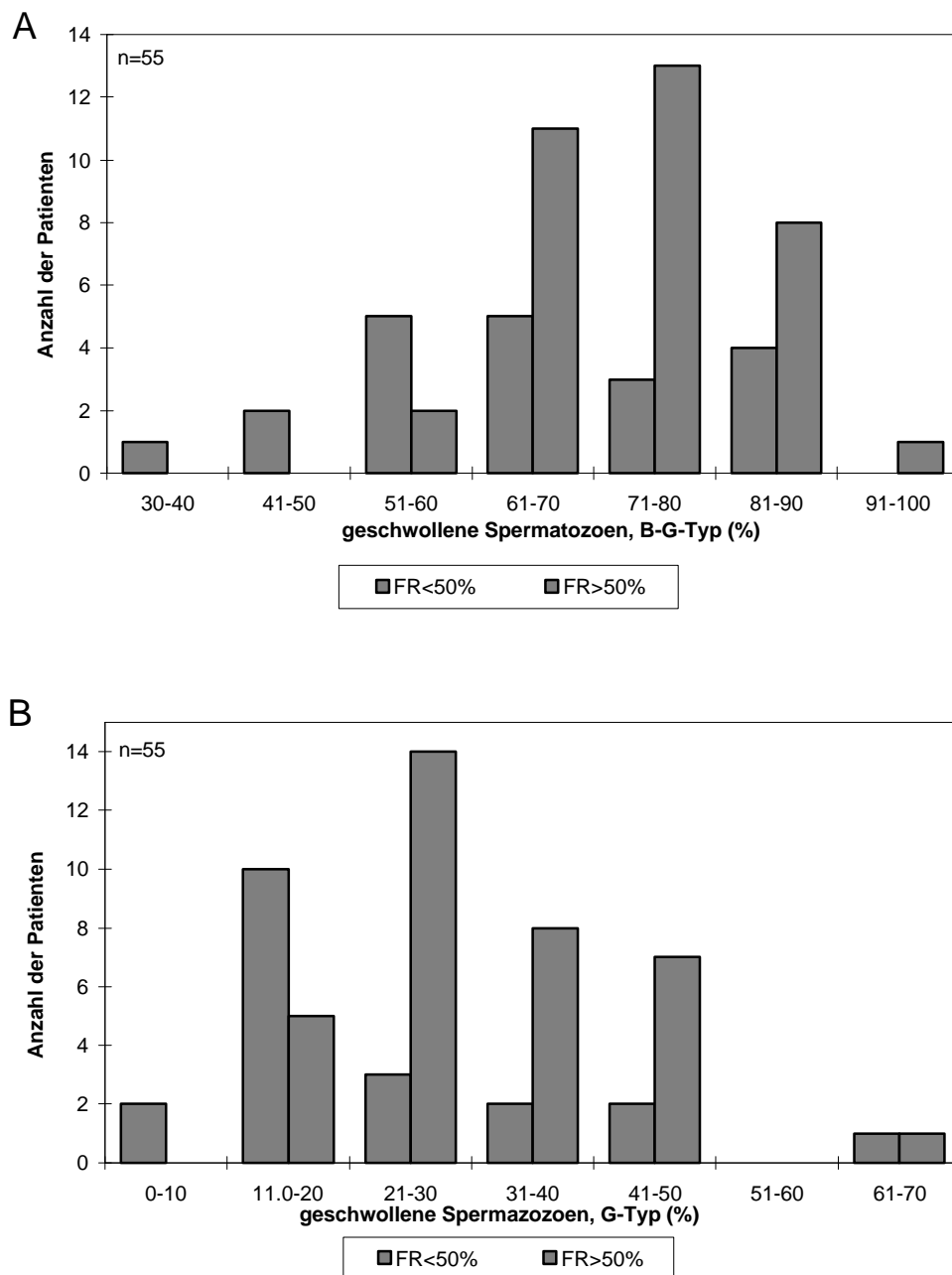


Abbildung 14: Kumulative Verteilung der Patienten für den Anteil B-G-Typ (A) und G-Typ Spermatozoen (B). Für Patienten mit einer Fertilisationsrate <50% (0% und 33%) ist für beide Parameter eine deutliche Linksverschiebung zu erkennen. Dagegen zeigt sich ein annähernd glockenförmiger Verlauf bei der Patientengruppe mit Fertilisationsraten >50% (66% und 100%).

4.3. Akrosomreaktion

4.3.1. Akrosomreaktion und Fertilisationsrate

Als weiterer Spermatozoenfunktionsparameter, welcher für eine erfolgreiche Fertilisation von Bedeutung ist, wurde die Akrosomreaktion untersucht und mit der Fertilisationsrate in vitro korreliert. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls an Aliquots der Ejakulate durchgeführt, mit denen Eizellen in vitro befruchtet wurden. Die Induzierte Reaktion (Testwert) ergab sich aus dem Anteil lebend akrosom-reagierter Spermatozoen nach Induktion mittels Niedrigtemperatur und anschließender Kapazitation. Zur Ermittlung der spontanen Akrosomreaktion (Kontrollwert) wurden die Spermatozoen lediglich kapazitiert. Die Induzierbarkeit der AR wurde aus der Differenz zwischen Testwert und Kontrollwert berechnet und gibt die Fähigkeit der Spermatozoen die Akrosomreaktion zu induzieren an. Sowohl der Testwert als auch die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion wurden mit der Fertilisationsrate korreliert.

Abbildung 15A zeigt den Anteil lebend akrosom-reagierter Spermatozoen nach Induktion mittels Niedrigtemperatur (Testwert) korreliert zur Fertilisationsrate (0%, 33%, 66% und 100%). Die Patienten mit einer Fertilisationsrate <50% unterschieden sich nicht signifikant von denen, die eine Fertilisationsrate >50% zeigten (H-Test: $P=0,693$). Dies änderte sich auch nicht nach Anwendung des SJ-Tests unter der Annahme einer monoton steigenden Tendenz. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für den SJ-Test betrug $P=0,366$.

Im Gegensatz dazu korrelierte die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion signifikant mit der Fertilisationsrate (Abbildung 15B). Die mittels H-Test ermittelte Irrtumswahrscheinlichkeit betrug $P=0,018$; bei Anwendung des SJ-Tests $P=0,004$.

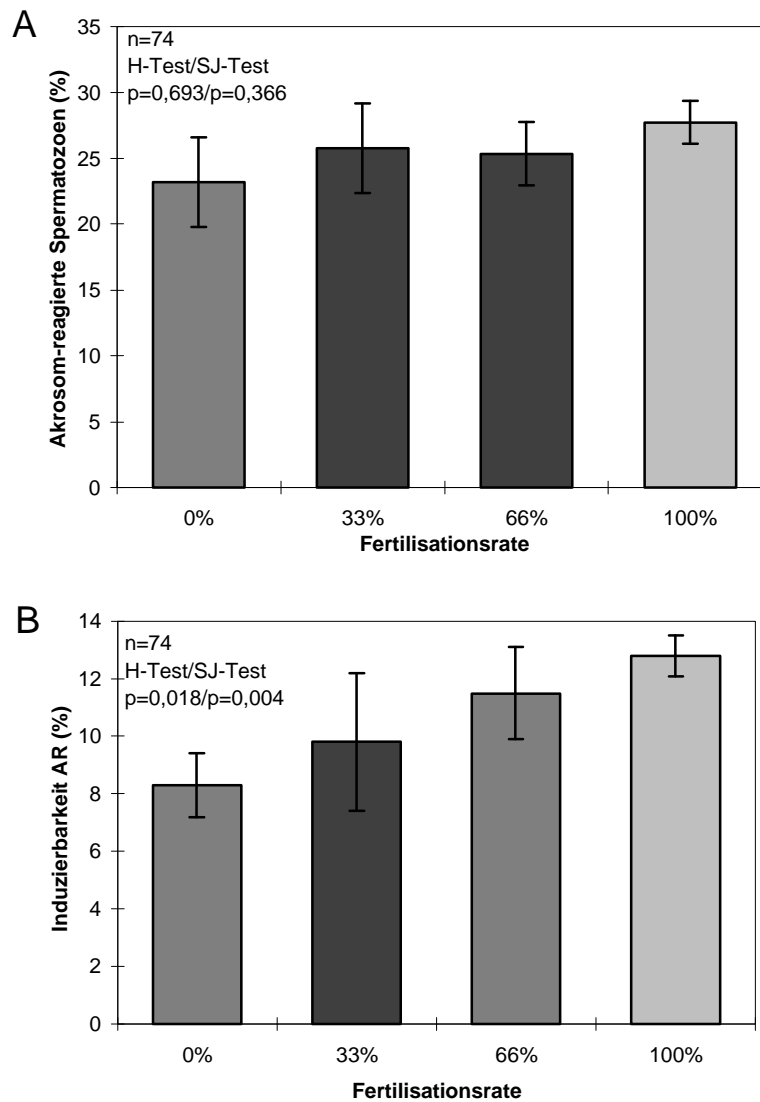
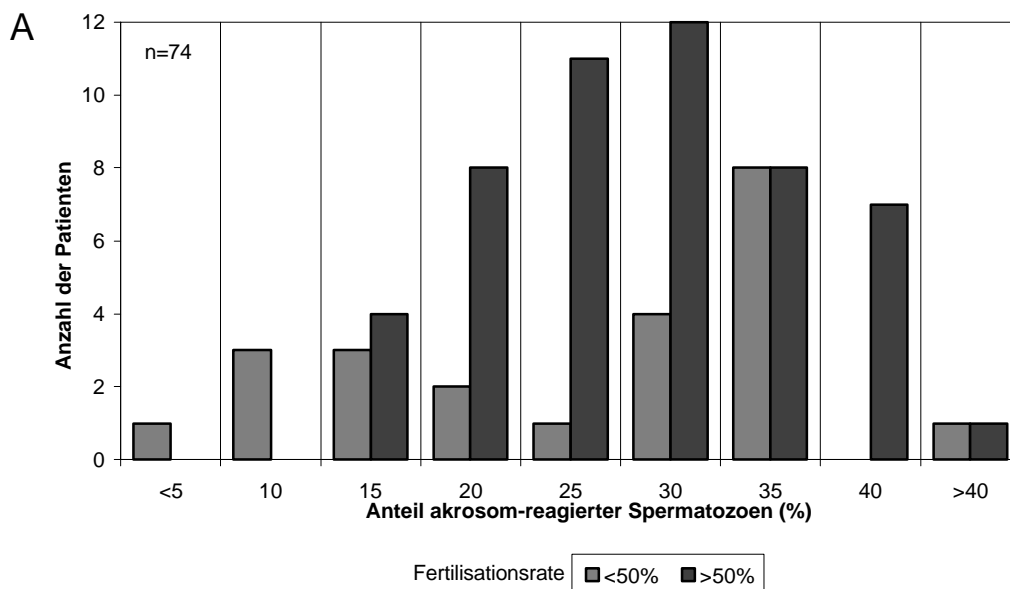


Abbildung 15: Korrelation des Anteils akrosom-reagierter Spermatozoen (A) und der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion (B) mit der Fertilisationsrate in vitro. Aufgrund der gesetzlichen Bestimmung durften zum Zeitpunkt der Untersuchung nur drei Eizellen inseminiert werden. Aus diesem Grund konnten nur vier Fertilisationsraten (0%, 33%, 66% und 100%) erhalten werden.

- A) Anteil lebend akrosom-reagierter Spermatozoen (\pm SEM) nach Induktion mittels Niedrigtemperatur korreliert mit der Fertilisationsrate. Die vier Patientengruppen unterscheiden sich nicht signifikant (H-Test: $P=0,693$; SJ-Test: $P=0,365$).
- B) Induzierbarkeit der AR (\pm SEM) korreliert zur Fertilisationsrate. Es zeigt sich sowohl im H-Test, als auch im SJ-Test ein signifikanter Zusammenhang ($P=0,018$ bzw. $P=0,0004$).

Nach Aufteilung der Patienten in zwei Gruppen, solche mit einer Fertilisationsrate >50% (Fertilisationsrate: 66% und 100%) und solche mit einer Fertilisationsrate <50% (Fertilisationsrate: 0% und 33%), wurde der Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen in definierten Schritten zur Anzahl der Patienten korreliert. In Abbildung 16A zeigt die kumulative Verteilung der Patienten für die Induzierte Akrosomreaktion bei Fertilisationsraten <50% einen zweigipfligen Verlauf. Ein Maximum lag zwischen 10,0% und 15,0%, das zweite zwischen 30,0% und 35,0%. Im Gegensatz dazu wies die Verteilung der Patienten mit hoher Fertilisation ein einzelnes Maximum zwischen 25% und 30% lebend akrosom-reagierter Spermatozoen auf. Innerhalb dieser Patientengruppe konnten keine Werte unter 13% beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde dies bei 21,7% des Kollektivs mit Fertilisationsraten <50% gesehen. Bei diesem Patientenkollektiv war die Verteilungskurve deutlich nach links verschoben.

In Abbildung 16B ist die kumulative Verteilung der Induzierbarkeit der Akrosomreaktion dargestellt. Das Maximum des Anteils akrosom-reagierter Spermatozoen der Patienten mit einer Fertilisationsrate <50% lag zwischen 5,0% und 7,5%. Diese Patientengruppe zeigte ebenfalls eine Linksverschiebung der Verteilungskurve.



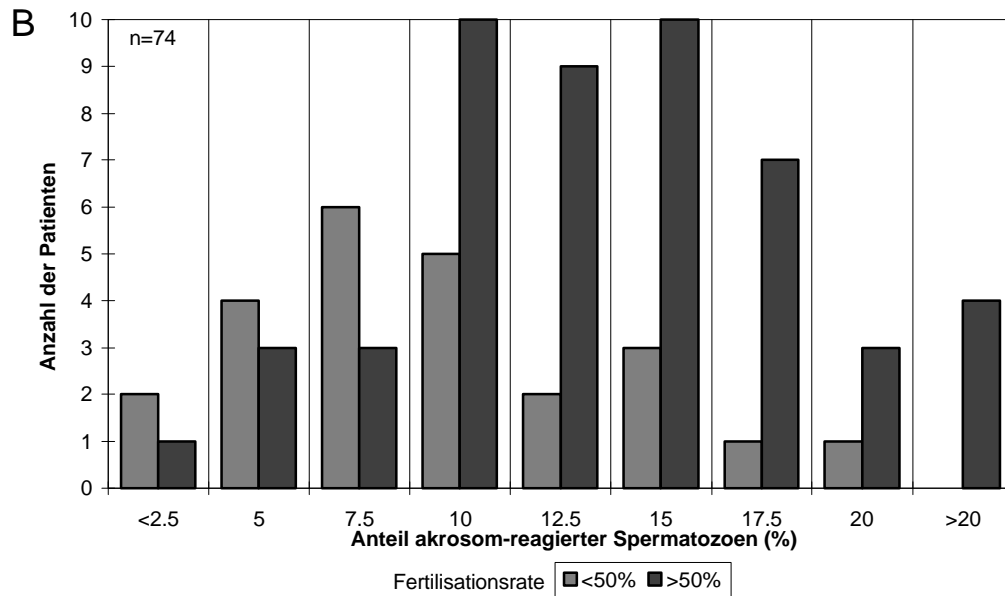


Abbildung 16: Korrelation der Anzahl der Patienten mit dem Anteil lebend akrosom-reagierter Spermatozoen nach Induktion durch Niedrigtemperatur (A) und der Induzierbarkeit der AR. Bei Patienten mit einer Fertilisationsrate >50% zeigt sich für beide Parameter ein annähernd eingipfliger Verlauf der Verteilungskurve. Die Patienten, deren Spermatozoen eine Fertilisationsrate <50% aufweisen, zeigen eine Linksverschiebung der Verteilungskurve und einen zweigipfligen Verlauf.

Tabelle 8 A und B zeigen unterschiedliche statistische Parameter für unterschiedliche Grenzwerte des Anteils lebend akrosom-reagierter Spermatozoen nach Induktion mittels Niedrigtemperatur und der Induzierbarkeit der AR.

Ein sehr deutlicher Abfall der Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fertilisation zeigte sich bei einem Anteil lebend akrosom-reagierter Spermatozoen <13%. Dies konnte auch für die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion bei Werten <7,5% beobachtet werden. Für diese Grenzwerte wurden mittels ROC-Kurven Analyse die in Tabelle 8 angegebenen Werte für Spezifität, Sensitivität sowie positiven und negativen Vorhersagewert berechnet.

Tabelle 8: Statistische Werte des Assays zur Bestimmung der Akrosomreaktion mittels Triple-Stain Technik für unterschiedliche Grenzwerte für den Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen (A) und die Induzierbarkeit der AR (B) nach Niedrigtemperatur. Berechnung der einzelnen statistischen Werte mittels ROC-Kurven Analyse und der Fertilisationsrate als Parameter.

A

	5%	10%	13%	15%
Spezifität (%)	4,3	17,4	21,7	30,4
Sensitivität (%)	100,0	100,0	98,0	94,1
Positiver Vorhersagewert (%)	100,0	100,0	83,3	70,0
Negativer Vorhersagewert (%)	69,6	72,8	73,5	75,0

B

	2,5%	5%	7,5%	10,0%
Spezifität (%)	8,3	25,0	50,0	70,8
Sensitivität (%)	98,0	92,0	86,0	66,0
Positiver Vorhersagewert (%)	66,6	60,0	63,1	50,0
Negativer Vorhersagewert (%)	69,0	71,8	78,2	82,5

4.3.2. Physiologische und nicht-physiologische Induktion der Akrosomreaktion

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der nicht-physiologischen (physikalischen) Induktion mittels Niedrigtemperatur und der physiologischen Induktion der AR durch humane Follikularflüssigkeit besteht, wurde die Induktion der AR durch beide Induktoren bei 18 Ejakulatproben gegenübergestellt.

In Abbildung 17 wurde jeweils die Induzierte AR und die Induzierbarkeit der AR beider Stimulationsmethoden miteinander korreliert. Für den Anteil lebend akrosom-reagierter Spermatozoen wurde ein Korrelationskoeffizient von $r=0,910$ (Abb. 17A) berechnet, für die Induzierbarkeit der AR von $r=0,8472$ (Abb. 17B). Für beide Werte lag die sich daraus ergebende Irrtumswahrscheinlichkeit $P<0,0001$.

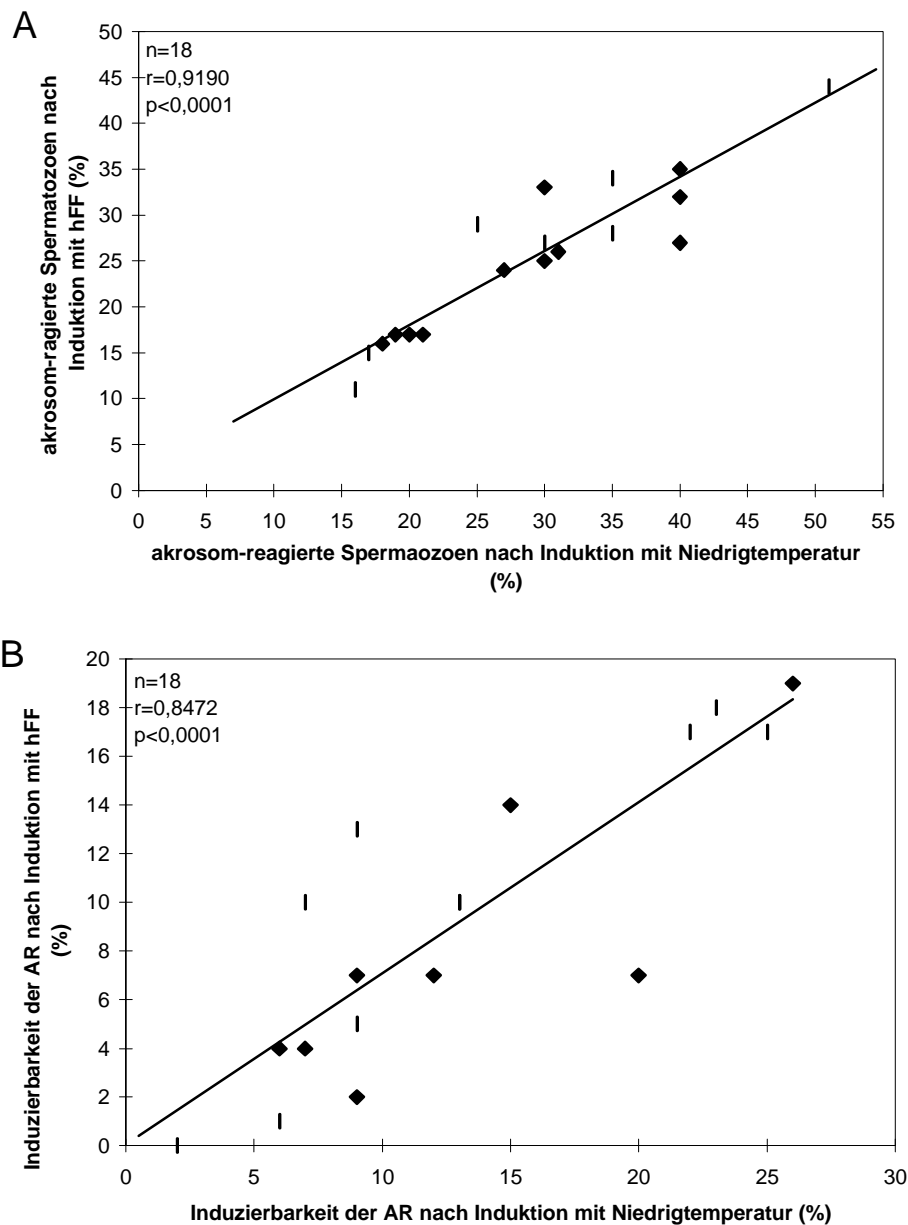


Abbildung 17: Korrelation des Anteils akrosom-reagierter Spermatozoen (A) und der Induzierbarkeit der AR (B) nach Induktion der AR mit einem physikalischen Stimulus (Niedrigtemperatur) und einem physiologischen Stimulus (hFF). Beide Methoden zeigen eine hohe Korrelation $r=0,8472$ (A) und $r=0,9190$ (B) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P<0,0001$.

4.4. Akrosinaktivität

4.4.1. Gelatinolyse Assay und Fertilisationsrate

Als weiterer Schritt dieser Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen der mittels Gelatinolysetechnik bestimmten Akrosinaktivität und der Fertilisationsrate untersucht werden.

Abbildung 18 zeigt exemplarisch den Gelatinolyse Assay bei drei Patienten. Als Folge der proteolytischen Aktivität der Spermatozoen bilden sich Lysishöfe (Halos) unterschiedlicher Größe um die einzelnen Spermatozoenköpfe. In Abbildung 18A sind deutlich ausgeprägte Halos zu erkennen, welche kennzeichnend für eine ausreichende Akrosinaktivität sind. Kleine, undeutlicher ausgebildete Halos weisen auf eine reduzierte Akrosinaktivität hin (Abb. 18B). In Abbildung 18C sind keine Halos erkennbar und deuten auf fehlende Akrosinaktivität in diesen Spermatozoen hin.

Für diese Untersuchung wurden Aliquots von 114 Ejakulaten verwendet, die zur Durchführung der in vitro-Fertilisation eingesetzt wurden. Die mittlere Spermatozoendichte (\pm SEM) dieser Patienten lag bei 56×10^6 Zellen/ml ($\pm 2,8$), der Anteil morphologisch normalgeformter Zellen bei 55% ($\pm 0,7$) und die mittlere Motilität betrug 45% ($\pm 0,7$).

Innerhalb der insgesamt untersuchten 114 Patienten zeigte sich in vier Fällen trotz fehlender Halobildung eine Fertilisationsrate $>50\%$. Die falsch-negativ Rate des Assays lag somit bei 3,5%. Für alle weiteren Auswertungen wurden lediglich valide Werte ($n=110$) verwendet.

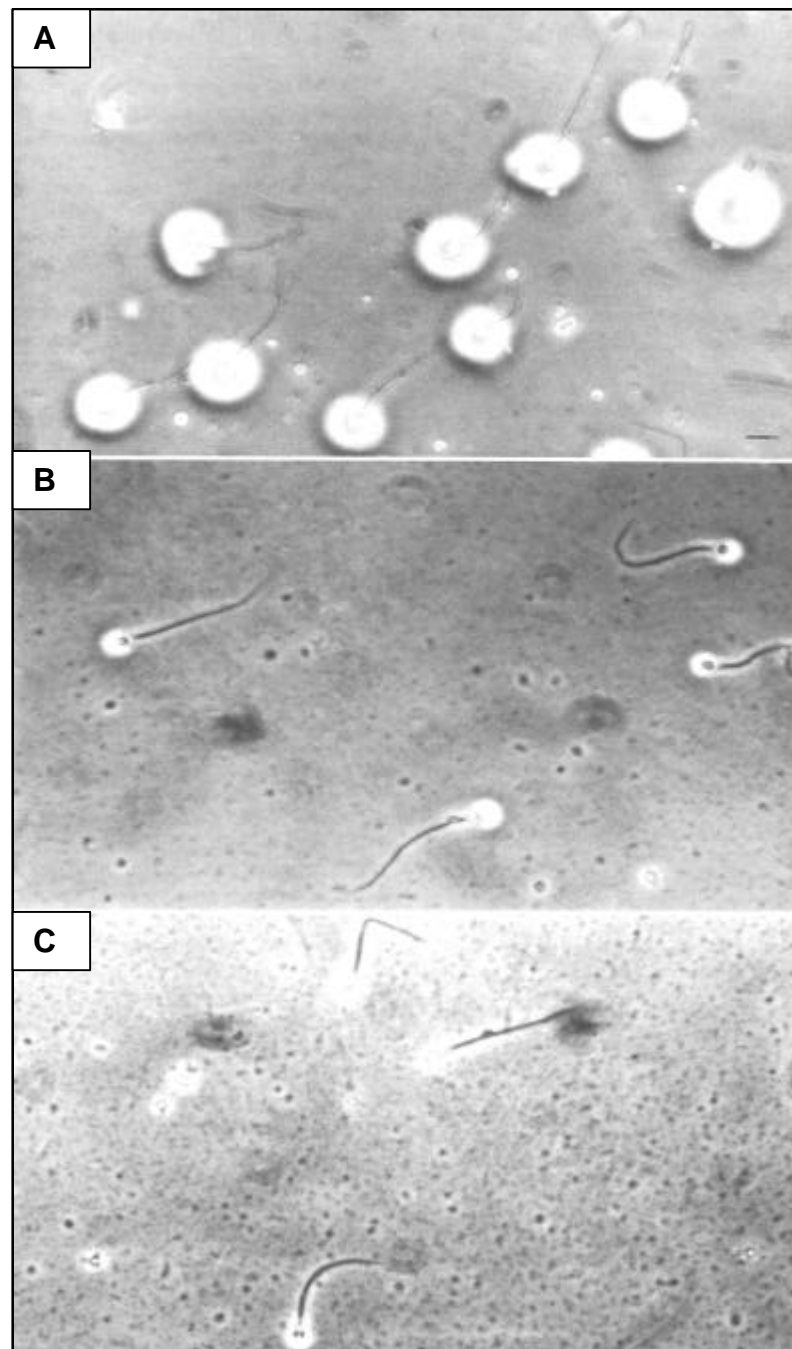


Abbildung 18: Humane Spermatozoen auf Gelatine-beschichteten Objektträgern nach zweistündiger Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C.

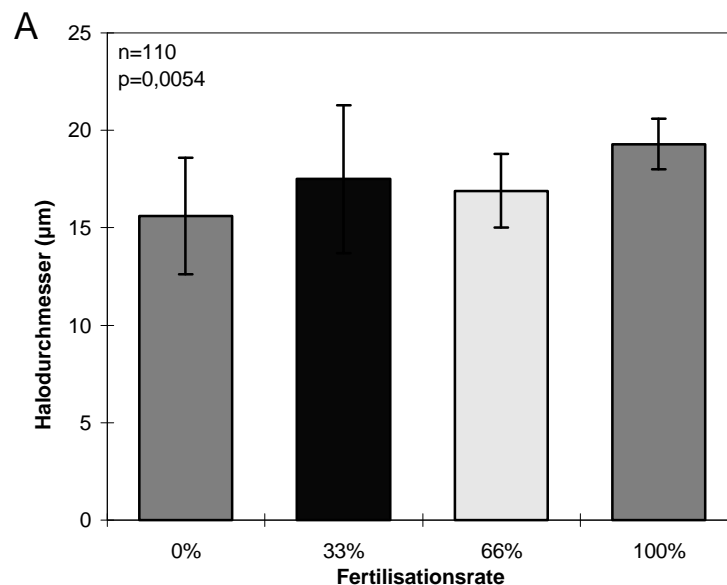
(Phasenkontrastmikroskop; 400fache Vergrößerung; Mikrometerbalken: 10 µm)

A: Spermatozoen von einem Patienten mit großen, deutlichen Halos, kennzeichnend für eine hohe Akrosinaktivität.

B: Spermatozoen von einem Patienten mit kleinen Halos, charakteristisch für eine niedrige Akrosinaktivität.

C: Spermatozoen von einem Patienten ohne Haloformation kennzeichnend für keine Akrosinaktivität. (aus HENKEL et al., 1995)

Halodurchmesser, Haloformationsrate und der berechnete Akrosinaktivitäts Index wurden gegen die Fertilisationsraten aufgetragen (Abb. 19). Die Mittelwerte der Halodurchmesser (Abb. 19A) für die verschiedenen Fertilisationsraten (0%, 33%, 66% und 100%) berechneten sich zu 15,6 μm , 17,5 μm , 16,9 μm und 19,3 μm . Obgleich der Korrelationskoeffizient mit $r=0,396$ relativ gering ist, unterschieden sich die Patienten, welche im IVF-Programm eine gute Fertilisation ($>50\%$) zeigten, von denen mit geringer Fertilisation ($<50\%$) signifikant ($P=0,0054$). Die errechneten Mittelwerte für die Haloformationsraten der vier Patientengruppen (68,0%, 64,7%, 72,4% und 77,8%) sind in Abbildung 19B dargestellt. Wiederum konnten signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit hoher und niedriger Fertilisation in vitro ermittelt werden ($P=0,0009$; $r=0,401$). Die Mittelwerte für den Akrosinaktivitäts Index (11,1, 11,2, 12,4 und 15,2) korrelierten ebenfalls hochsignifikant mit der Fertilisationsrate ($P=0,0003$; $r=0,428$) (Abb. 19C).



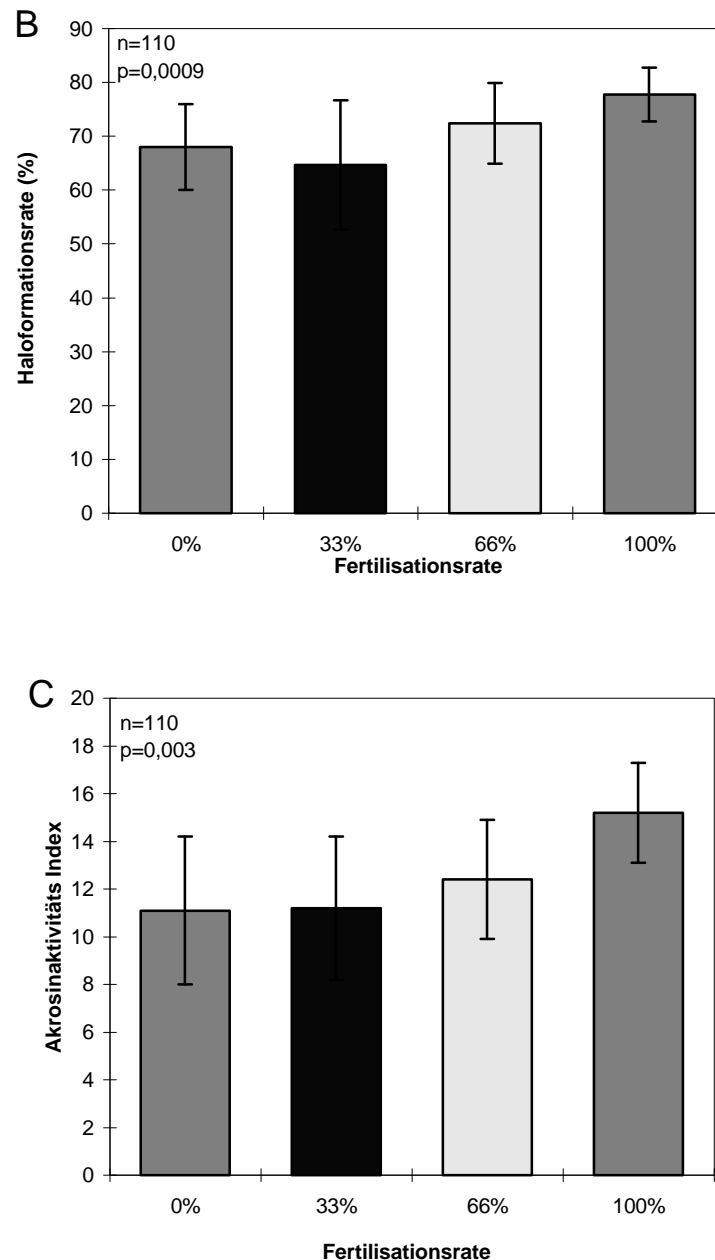
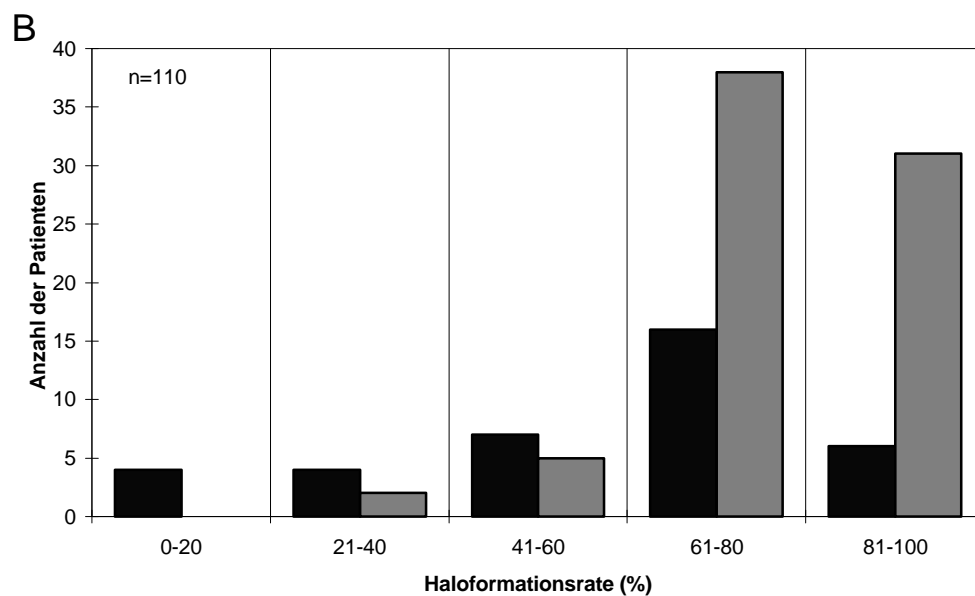
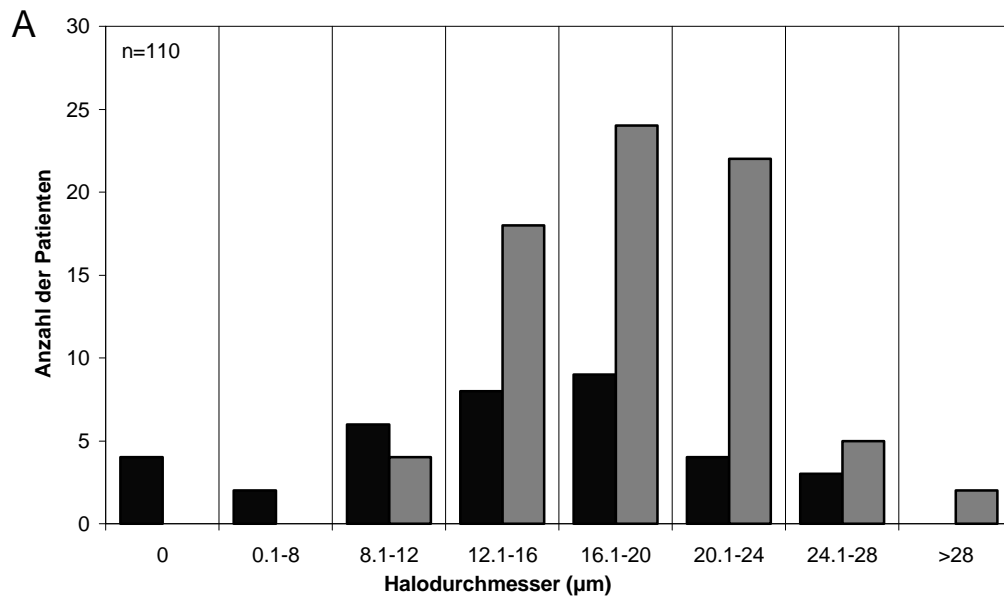


Abbildung 19: Korrelation von mittlerem Halodurchmesser in μm ($\pm\text{SEM}$) (A), Haloformationsrate in % ($\pm\text{SEM}$) (B) und Akrosinaktivitäts Index ($\pm\text{SEM}$) (C) mit der Fertilisation *in vitro*. Die vier Patientengruppen unterscheiden sich signifikant hinsichtlich aller drei Parameter. (U-Test; A: $P=0,0054$, $r=0,396$; B: $P=0,0009$, $r=0,401$; C: $P=0,0003$, $r=0,428$).

Bei Aufteilung der Patienten in zwei Gruppen, zum einen mit hoher ($\text{FR}>50\%$) und zum anderen mit niedriger Fertilisationsrate ($\text{FR}<50\%$), zeigte die kumulative Verteilung, insbesondere für den Halodurchmesser (Abb. 20A), einen eingipfligen Verlauf. Die Patienten mit einer Fertilisationsrate $<50\%$ dagegen wiesen eine deutliche Linksverschiebung zu niedrigeren Werten hin auf (Abb. 20A, B, C). Die

geringsten Werte fanden sich lediglich in dieser Patientengruppe. Die Ergebnisse deuteten eindeutig darauf hin, daß für die Fertilisation sowohl Halodurchmesser als auch Haloformationsrate eine Rolle spielen.



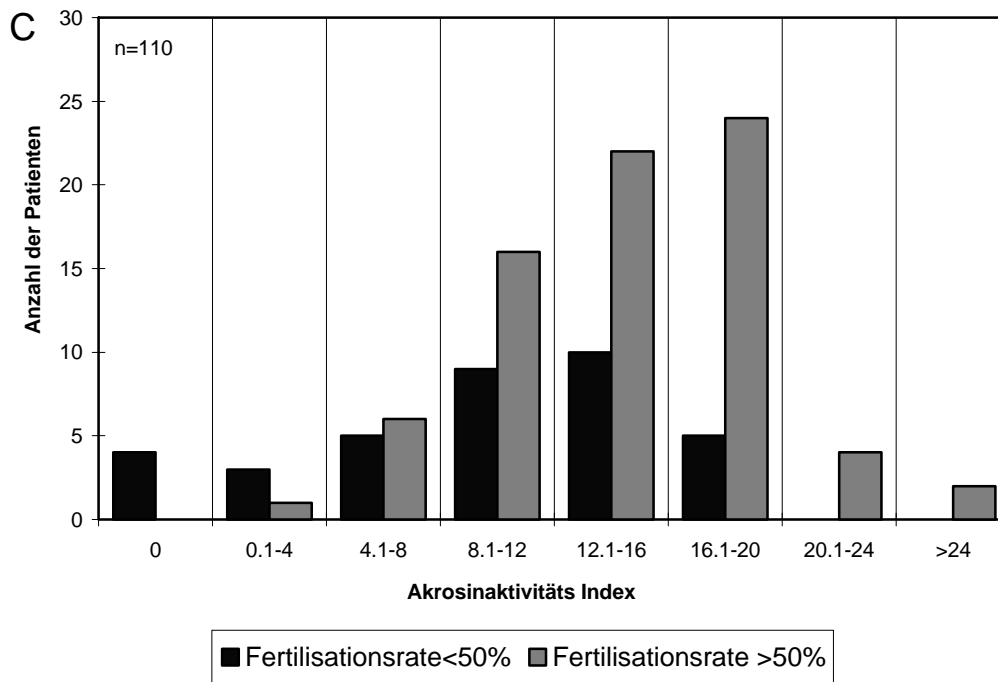


Abbildung 20: Kumulative Verteilung der Patienten für den Halodurchmesser (A), die Haloformationsrate (B) und den Akrosinaktivitäts Index (C). Die Patienten sind in zwei Kollektive eingeteilt: Vor allem für den Halodurchmesser der Patienten mit guter Fertilisation in vitro zeigt sich ein eingipfliger Verlauf. Für alle Parameter gilt bei einer Fertilisationsrate <50% eine Linksverschiebung der Verteilungskurve.

Die Berechnung der Spezifität, Sensitivität sowie positiver und negativer Vorhersagewerte für den Gelatinolysetest mittels ROC-Kurven Analyse ergab, daß bei einem Halodurchmesser von 10 μm oder 12 μm die Spezifität bei 98,7% bzw. 94,7% lag (Sensitivität: 25,7% bzw. 31,4%). Bei 10 μm zeigten 70% der Patienten eine Haloformationsrate <60%. Alle diese Patienten waren infertil (Fertilisationsrate: 0%). Wurde als Kriterium der Grenzwert für die Haloformationsrate <60% gewählt sinkt die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fertilisation. Die Spezifität hierfür wurde mit 92% berechnet bei relativ geringer Sensitivität (37,1%). Zusammenfassend ergab die Berechnung von Spezifität, Sensitivität, sowie von positivem und negativem Vorhersagewert mittels ROC-Kurven Analyse, daß bei einem Halodurchmesser <10 μm , einer Haloformationsrate <60% und dem daraus errechneten Akrosinaktivitäts Index <6 die Chance einer erfolgreichen Fertilisation deutlich sank (Tab. 9).

Tabelle 9: Verschiedene Grenzwerte für Halodurchmesser, Haloformationsrate und Akrosinaktivitäts Index und die entsprechenden statistischen Werte für Spezifität, Sensitivität sowie positiver und negativer Vorhersagewert nach Berechnung mittels ROC-Kurven Analyse.

	Halodurchmesser (10 μm) (12 μm)		Haloformations- rate (60%)	Akrosinaktivitäts Index (6) (10) (12)		
Spezifität (%)	98.7	94.7	92.0	97.3	84.0	77.6
Sensitivität (%)	25.7	31.4	37.1	25.7	51.4	46.5
Positiver Vorhersagewert (%)	90.0	73.3	68.4	81.8	60.0	57.1
Negativer Vorhersagewert (%)	74.0	74.7	75.8	73.7	78.8	69.3

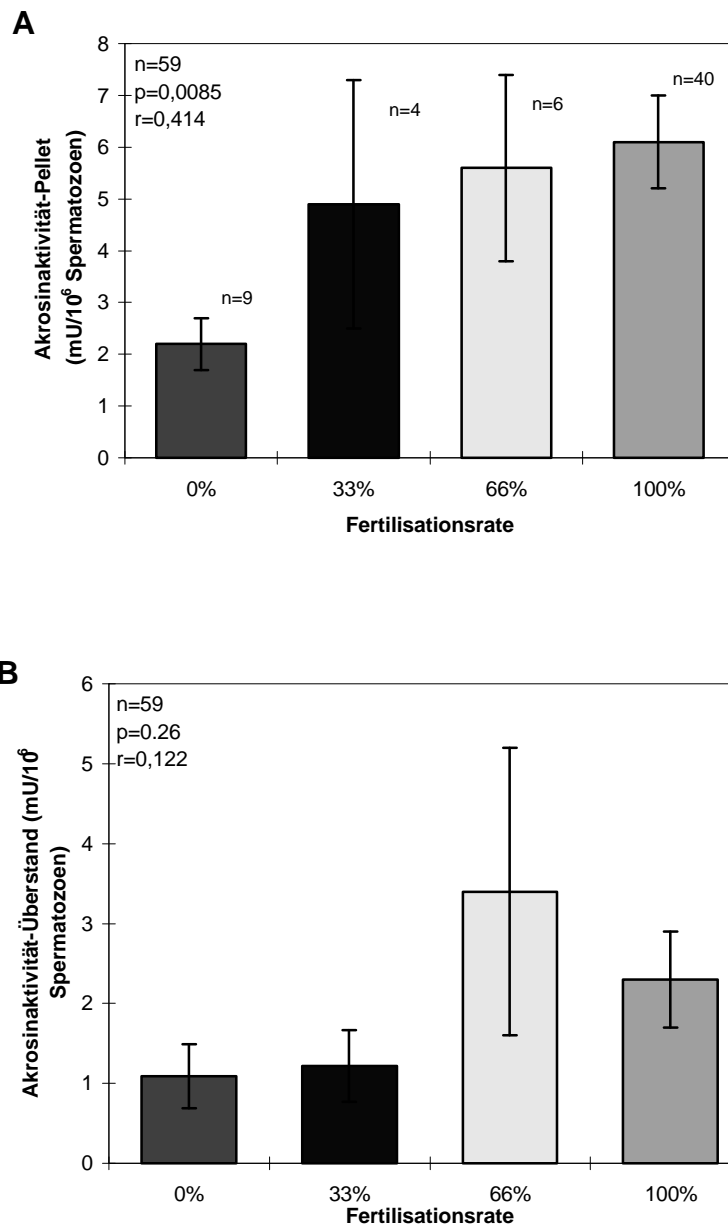
4.4.2. Photometrische Bestimmung der Akrosinaktivität

Neben der Gelatinolysetechnik als visuelle Methode zur Beurteilung der Akrosinaktivität anhand der Halobildung, welche kennzeichnend für die Akrosinaktivität ist, wurde die esterolytische Aktivität der Protease mit der Spektralphotometrie gemessen und deren Zusammenhang zur Fertilisation in vitro überprüft. Es wurde die mittels Photometer gemessene Akrosinaktivität im Überstand, im Pellet sowie in beidem zusammen ($\text{mU}/10^6$ Spermatozoen), mit der Fertilisationsrate in vitro korreliert.

Zur Durchführung des photometrischen Assays mit BAEE/ADH-Nachweis (s. 3.7.2.) wurden Aliquots von 59 Ejakulaten verwendet, die zur Durchführung der in vitro-Fertilisation eingesetzt wurden. Desweiteren wurde bei 44 dieser Patienten zusätzlich der unter 3.7.1. beschriebene Gelatinolyse Assay durchgeführt und die Ergebnisse der beiden Methoden miteinander verglichen.

Sowohl die Akrosinaktivität im Pellet (Abb. 21A), als auch die aufsummierten Werte in Pellet und Überstand (Abb. 21C), korrelierten signifikant mit der Fertilisationsrate in vitro (H-Test; A: $P=0,0085$; $r=0,414$; B: $P=0,05$; $r=0,363$). Die mittleren Werte für die Akrosinaktivität des Pellets der verschiedenen Patientengruppen (0%, 33%, 66% und 100% Fertilisationsrate) betrugen 2,2, 4,9, 5,6 und 6,1 $\text{mU}/10^6$ Spermatozoen. Die entsprechenden Werte für die Akrosinaktivität in Überstand+Pellet berechneten sich

zu 3,3, 6,1, 8,9 und 8,4 mU/10⁶ Spermatozoen. Lediglich die Akrosinaktivität im Überstand (B) zeigte keinen signifikanten Zusammenhang mit der Fertilisationsrate (P=0,26; r=0,122).



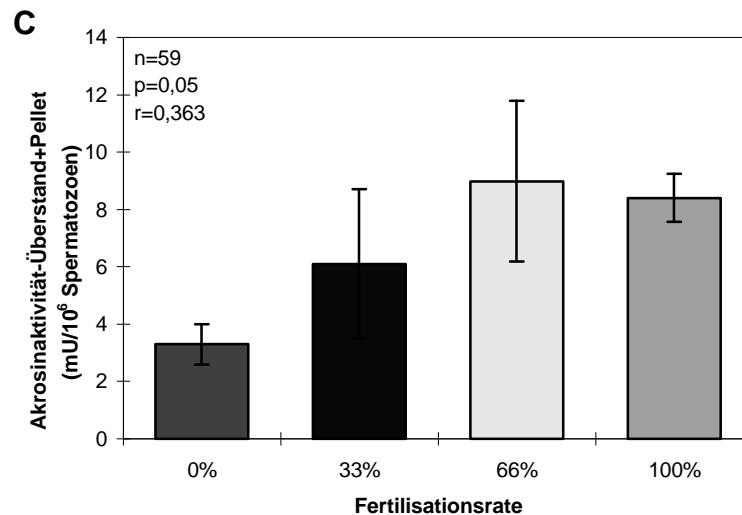


Abbildung 21: Korrelation der Akrosinaktivität (\pm SEM) im Pellet (A), Überstand (B) und in Überstand+Pellet (C) mit der Fertilisation *in vitro*. Für (A) und (C) ergibt sich nach Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit P mittels H -Test ein signifikanter Unterschied der vier Patientengruppen ($P=0,0085$; $P=0,05$).

4.4.3. Gelatinolyse Assay und photometrische Akrosinbestimmung

Zum Vergleich der photometrisch bestimmten Akrosinaktivität mit dem Gelatinolyse Assay, wurde jeweils die Akrosinaktivität aus Pellet, Überstand und Pellet+Überstand mit dem Halodurchmesser und dem Akrosinaktivitäts Index korreliert. Hierzu wurde von 44 Ejakulaten ein Aliquot für die Gelatinolysetechnik und ein zweites Aliquot zur photometrischen Akrosinbestimmung verwendet. Es zeigte sich eine geringe, aber trotzdem signifikante Korrelation zwischen der Akrosinaktivität aus Überstand+Pellet und dem Halodurchmesser ($r=0,386$; $P=0,0097$). Ein etwas geringerer Korrelationskoeffizient wurde zwischen der Akrosinaktivität im Pellet und dem Halodurchmesser ermittelt ($r=0,300$; $P=0,048$) (Abb. 22). Für die anderen durchgeführten Korrelationen, welche die Aktivität des Überstands betrafen, konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachgewiesen werden, so daß diese Daten hier nicht weiter ausgeführt wurden.

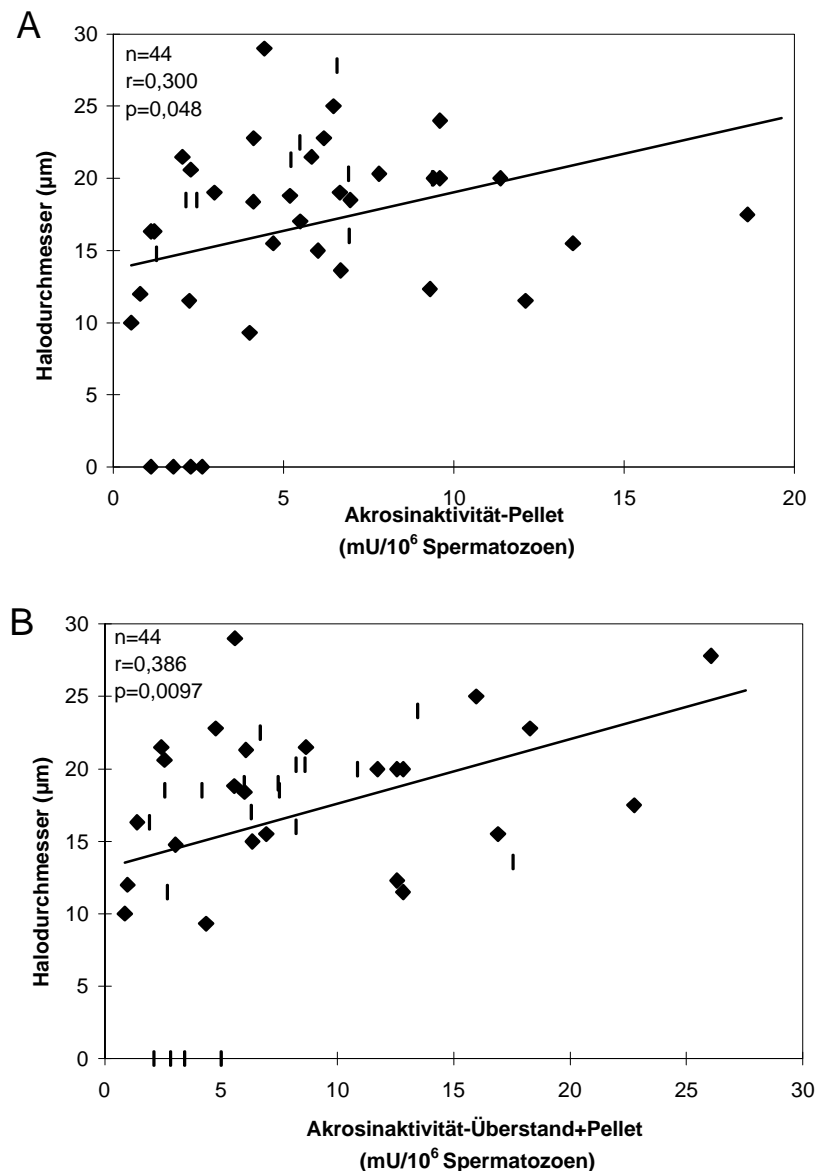


Abbildung 22: Korrelation der Akrosinaktivität im Pellet (A) und in Überstand+Pellet (B) des photometrischen Assays (mU/ 10^6 Spermatozoen) mit dem Halodurchmesser (μm) der Gelatinolysetechnik. Es zeigt sich ein Korrelationskoeffizient von $r=0,300$ für (A) bzw. $r=0,386$ für (B). Die jeweiligen Irrtumswahrscheinlichkeiten für die lineare Korrelation betragen $P=0,048$ und $P=0,0097$.

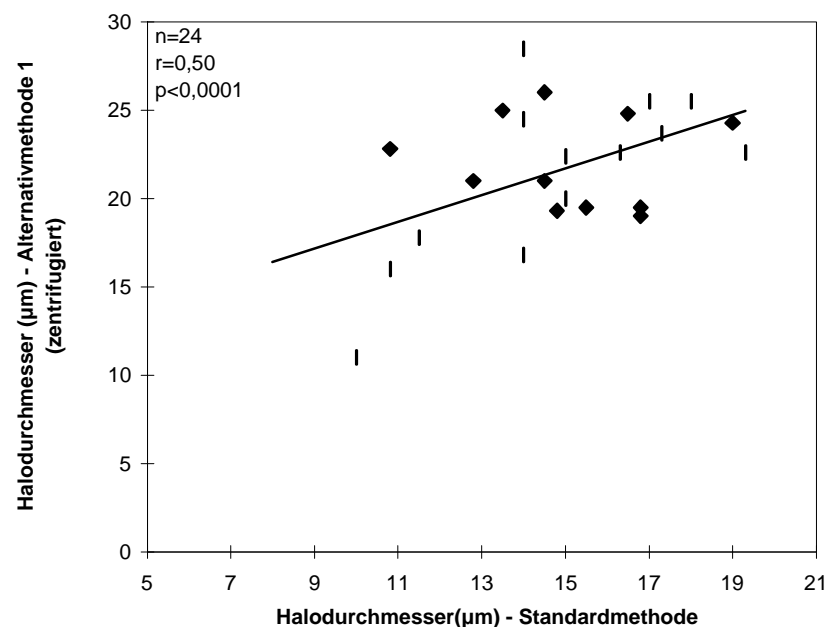
4.4.4. Alternativmethoden der Gelatinolysetechnik

Sowohl die Anwesenheit von Akrosininhibitoren im Seminalplasma als auch dessen hoher Proteingehalt kann zur Verringerung bis hin zum Verhindern der Haloausbildung führen. Auch eine ungleichmäßige bzw. zu dünne Gelatinebeschichtung der Objektträger bewirkt eine uneinheitliche Haloformation und

unterschiedliche Durchmesser der einzelnen Halos. Die Folge davon können falsch negative Ergebnisse sein. Um dies zu vermeiden und um die Auswertung zu erleichtern, wurde die Gelatinolysetechnik, wie unter 3.7.1.3. beschrieben, modifiziert. Bei Alternativmethode 1 wurden die Ejakulatproben mit Puffer gewaschen, um die im Seminalplasma vorhandenen Akrosinhibitoren weitestgehend zu eliminieren. In der zweiten Modifikation (Alternativmethode 2) erfolgte eine Beschichtung der Objektträger mit 60µl Gelatinesuspension, anstatt 40µl. Diese beiden Alternationen wurden in Alternativmethode 3 kombiniert, also dickere Gelatinebeschichtung und Zentrifugation zur Entfernung des Seminalplasmas.

Für die Alternativmethode 1 wurden bei 24 Aliquots von Ejakulaten der andrologischen Routinesprechstunde Akrosinhibitoren mittels Zentrifugation aus dem Seminalplasma weitestgehend entfernt. Der Vergleich von Halodurchmesser (A) und Akrosinaktivitäts Index (B) in der klassischen Gelatinolysetechnik und Alternativmethode 1 zeigte annähernd identische Korrelationskoeffizienten ($r=0,50$; $r=0,47$) (Abb. 23).

A



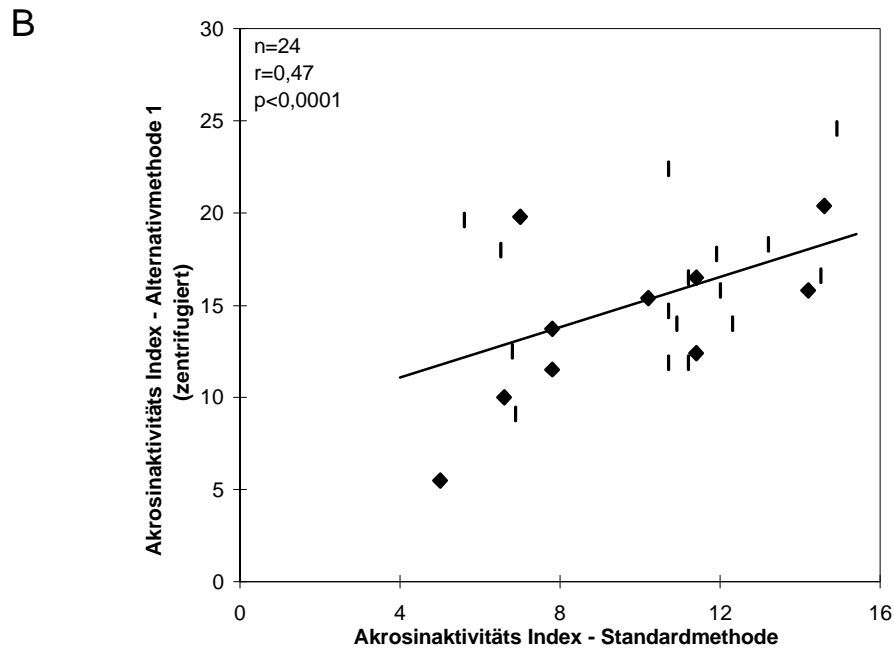
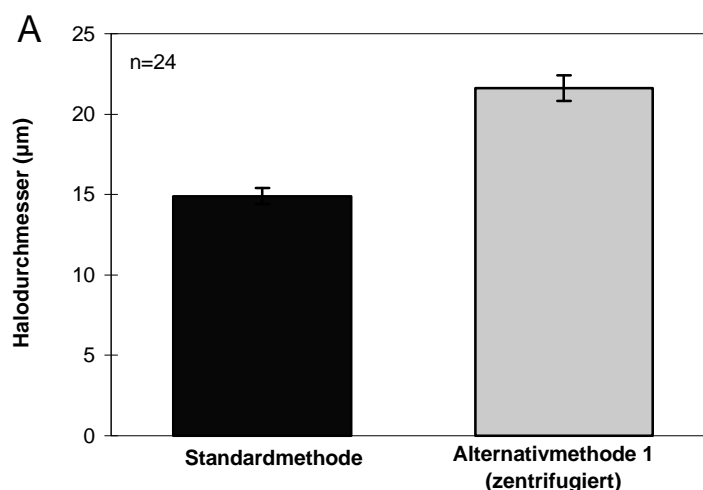


Abbildung 23: Vergleich des Halodurchmessers (A) und des Akrosinaktivitäts Index (B) unter Verwendung der konventionellen Gelatinolysetechnik (Standardmethode) und der Alternativmethode 1 (Zentrifugation des Ejakulats). Es zeigen sich sehr ähnliche Korrelationen $r=0,50$ (A) bzw. $r=0,47$ (B). Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt für beide Parameter $P<0,0001$ (T-Test).

Die Berechnung der Mittelwerte (\pm SEM) für den Halodurchmesser und Akrosinaktivitäts Index ergaben $21,6 (\pm 0,8)$ und $15,3 (\pm 0,8)$ für Alternativmethode 1 bzw. $14,9 (\pm 0,5)$ und $10,2 (\pm 0,6)$ in der Standardmethode. (Abb. 24A,C). Sie lagen damit signifikant höher (T-Test: $P<0,0001$) als bei der Standardmethode.

Im Gegensatz hierzu zeigte die Haloformationsrate mit $68,5\% (\pm 4,9\%)$ und $70,8\% (\pm 4,5\%)$ keinen signifikanten Unterschied (Abb. 24B).



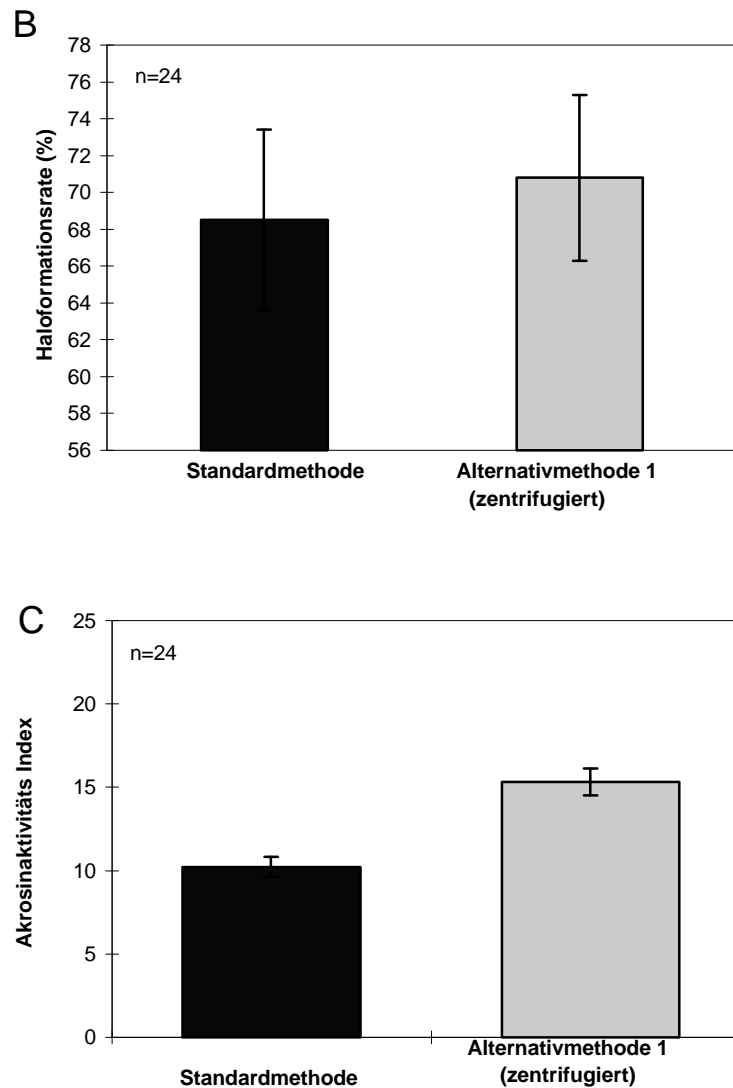
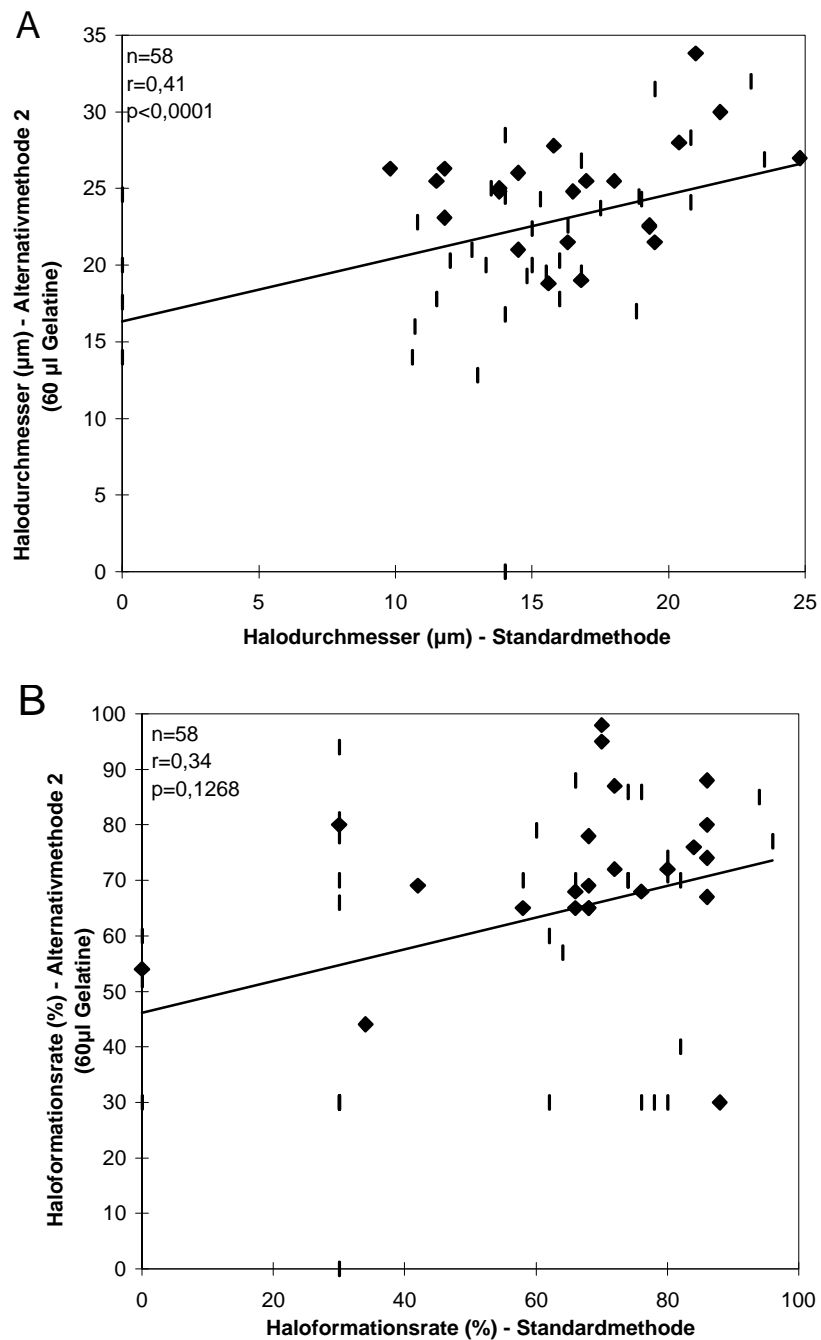


Abbildung 24: Vergleich von Halodurchmesser (A), Haloformationsrate (B) und Akrosinaktivitäts Index (C) nach Anwendung der Standardmethode im Vergleich mit der Alternativmethode 1 nach Zentrifugation. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte (\pm SEM). Die mittels T-Test für abhängige Stichproben berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit für den Halodurchmesser und den Akrosinaktivitäts Index beträgt $P < 0,0001$.

Bei Alternativmethode 2 wurde zur Gelatinebeschichtung anstatt 40 μ l 60 μ l Gelatinelösung verwendet. 58 Ejakulatproben aus der andrologischen Routinesprechstunde wurden eingesetzt. Insgesamt waren die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Parameter zwischen Standardmethode und Alternativmethode 2 niedriger als bei dem vorhergehenden Versuch (Abb. 25). Die Mittelwerte für Halodurchmesser, Haloformationsrate und Akrosinaktivitäts Index

(Abb. 26) zeigten mit $22,5 \mu\text{m}$ ($\pm 0,71$), 63% ($\pm 2,8$) und $14,7$ ($\pm 0,9$) ähnliche Ergebnisse wie bei Alternativmethode 1 ($21,6 \mu\text{m}$, $70,8\%$ und $15,3$).



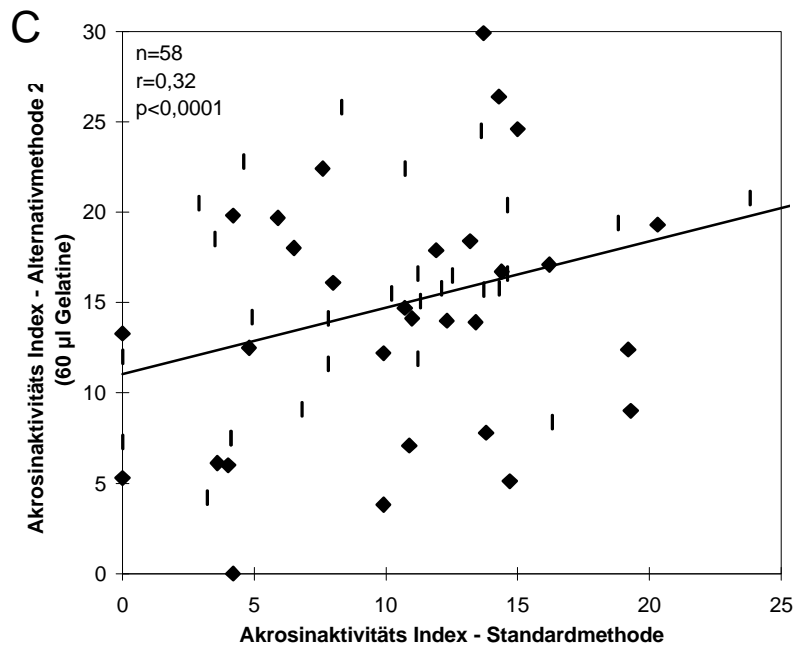


Abbildung 25: Korrelation zwischen Halodurchmesser (A), Haloformationsrate (B) und Akrosinaktivitäts Index (C) jeweils in der Standardmethode und Alternativmethode 2, nach Verwendung dicker beschichteter Objektträger. Für sämtliche Parameter zeigen sich ähnliche Korrelationskoeffizienten. Halodurchmesser und Akrosinaktivitäts Index der Alternativmethode 2 unterscheiden sich nach Anwendung des T-Tests signifikant von den entsprechenden Werten in der klassischen Gelatinolysetechnik ($P<0,0001$). Dies gilt nicht für die Haloformationsrate ($P=0,1268$).

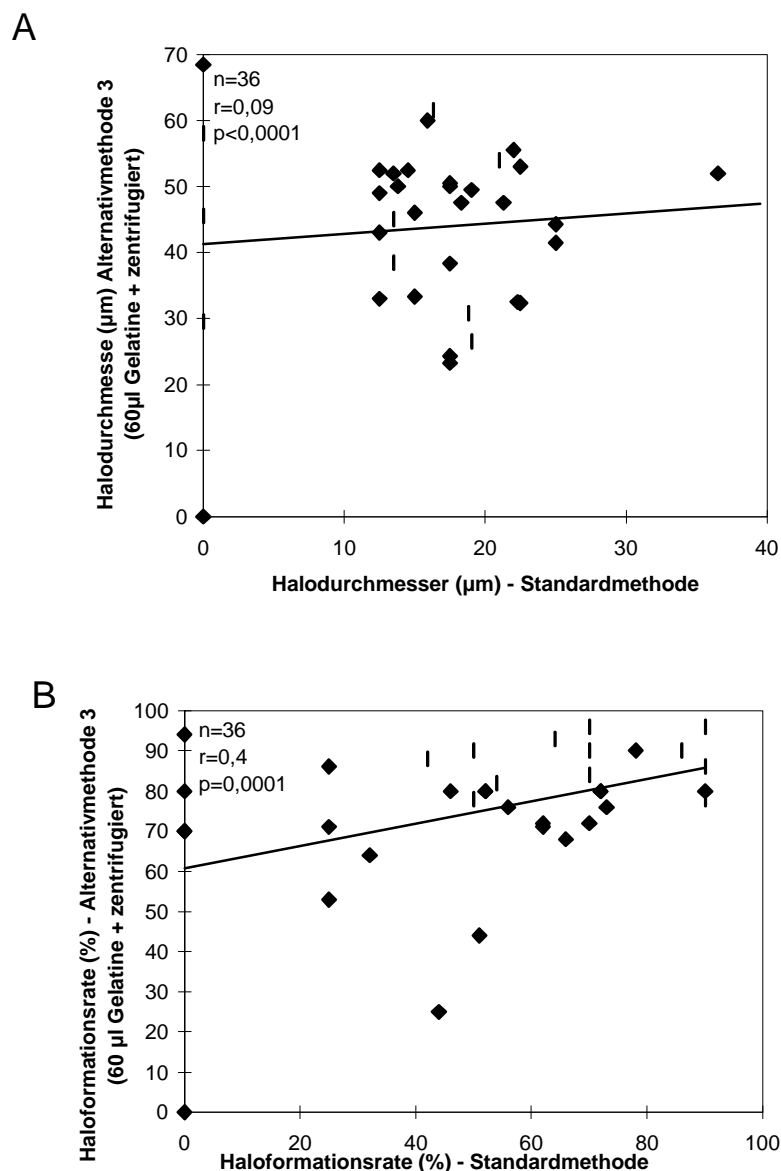
Der Vergleich des mittleren Halodurchmessers aus Alternativmethode 2 mit dem entsprechenden Ergebnis aus Alternativmethode 1 ergab annähernd identische Werte von $22,5 \mu\text{m}$ ($\pm 5,4$) bzw. $21,6$ ($\pm 3,9$) μm . Die entsprechenden Werte in der Standardmethode lagen bei $15 \mu\text{m}$ ($\pm 5,3$) bzw. $14,9 \mu\text{m}$ ($\pm 2,5$). Somit ergaben sich hinsichtlich des Halodurchmessers ähnliche Steigerungsraten zwischen der jeweiligen Alternativmethode 1 bzw. 2 und der klassischen Gelatinolyse. Das gleiche galt für den Akrosinaktivitäts Index, der sich in Alternativmethode 2 zu $14,7$ ($\pm 6,3$) berechnete, verglichen mit $15,3$ ($\pm 4,1$) in Methode 1. Die Haloformationsraten zwischen Standardmethode und Alternativmethode 2 unterschieden sich nicht signifikant mit Werten von $58,8\%$ ($\pm 25,6$) bzw. 63% ($\pm 21,4$) (Abb. 26B).



Abbildung 26: Vergleich des mittleren Halodurchmessers (A), der mittleren Haloformationsrate (B) und des Akrosinaktivitäts Index (C) der Standardmethode mit der Alternativmethode 2. Bei Halodurchmesser und Akrosinaktivitäts Index unterscheiden sich Standardmethode und Alternativmethode 2 höchst signifikant (T-Test: $P < 0,0001$). Bei der Haloformationsrate (B) ist hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden festzustellen ($P = 0,1268$).

In Alternativmethode 3 wurden die vorhergehenden Modifikationen der Gelatinolysetechnik kombiniert. Dabei wurden 36 Ejakulatproben aus der andrologischen Sprechstunde vor dem Einsatz im Gelatinolyse Assay gewaschen und zur Inkubation in der feuchten Kammer wurde die Spermatozoensuspension auf den mit 60 μ l Gelatinelösung beschichteten Objektträgern aufgetragen.

Sowohl Halodurchmesser (A), Haloformationsrate (B) als auch Akrosinaktivitäts Index (C) der Alternativmethode 3 wurden mit den Werten der klassischen Methode korreliert (Abb. 27). Der Halodurchmesser zeigte keine Korrelation ($r=0,09$). Für die Haloformationsrate lag der Korrelationskoeffizient bei $r=0,4$ ($P=0,0001$) und für den Akrosinaktivitäts Index bei $r=0,25$ ($P<0,0001$).



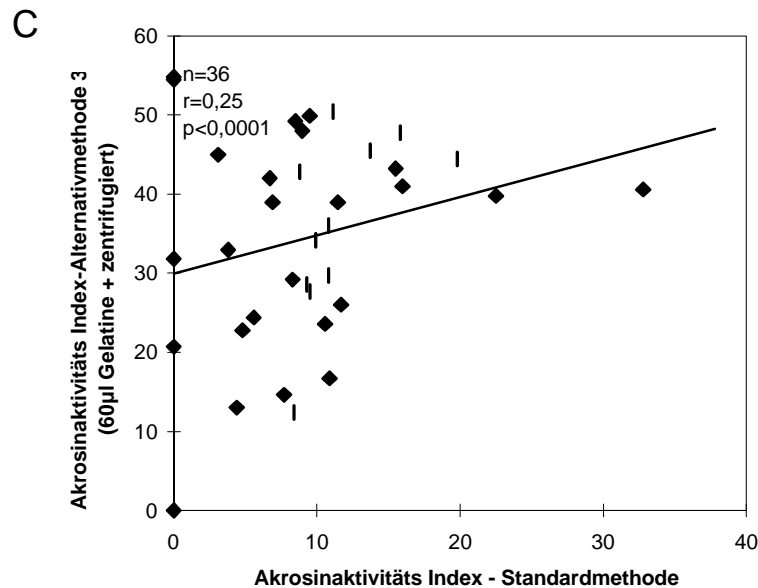
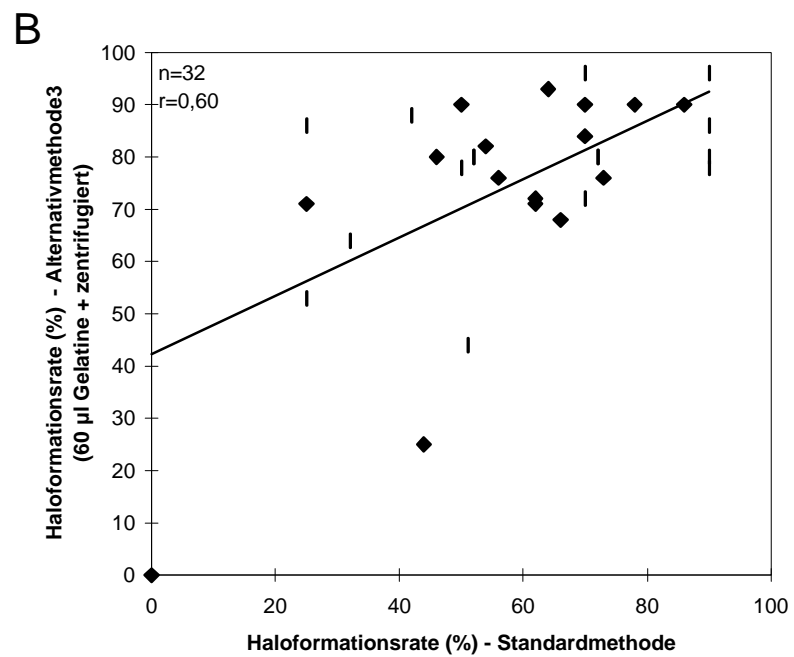
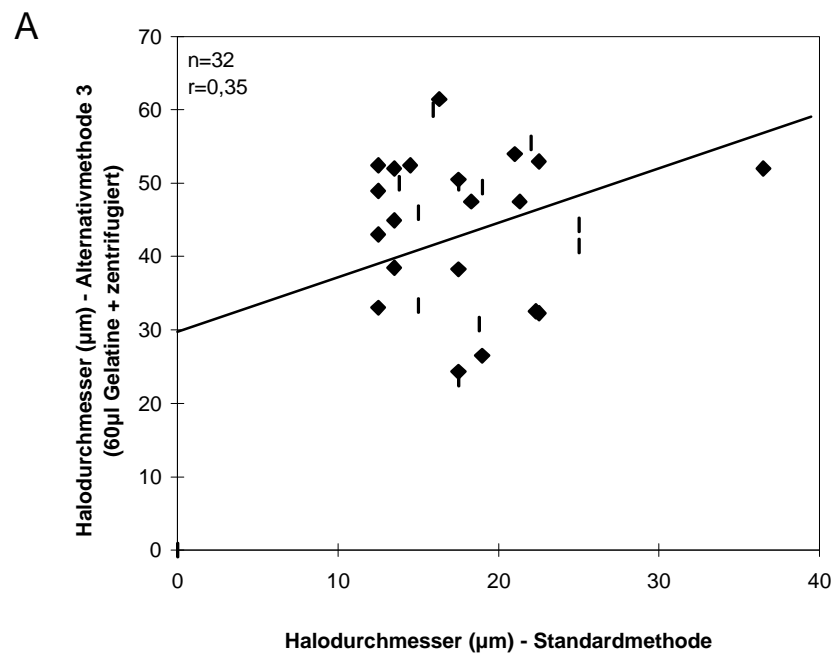


Abbildung 27: Korrelation von Halodurchmesser (A), Haloformationsrate (B) und Akrosinaktivitäts Index (C) bestimmt mit der Standardmethode der Gelatinolyse und der Alternativmethode 3 (nach Zentrifugation und Beschichtung der Objektträger mit 60 µl Gelatine). (A: $r=0,09$, $P<0,0001$; B: $r=0,4$, $P=0,0001$; C: $r=0,25$, $P<0,0001$; T-Test für abhängige Stichproben).

Auffallend war, daß mit der Alternativmethode 3 bei vier Patienten, die in der Standardmethode keine Haloformation zeigten, eine ausreichende Haloausbildung nachzuweisen war. Unter der Annahme falsch-negativer Ergebnisse bei diesen Patienten in der Standardmethode, zeigt Abbildung 28 nach Eliminierung dieser vier Werte die Korrelationskoeffizienten zwischen beiden Methoden für den Halodurchmesser (A: $r=0,35$), die Haloformationsrate (B: $r=0,6$) und den Akrosinaktivitäts Index (C: $r=0,41$).



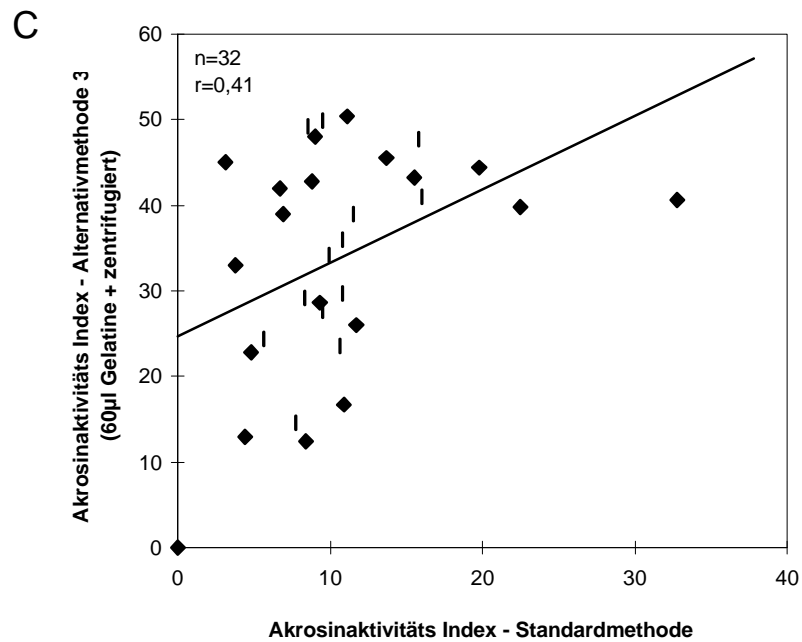


Abbildung 28: Korrelationen zwischen Halodurchmesser (A), Haloformationsrate (B) und Akrosinaktivitäts Index (C) bestimmt mit der Standardmethode der Gelatinolyse und Alternativmethode 3 nach Weglassen der vier "falsch-negativen Werte". Es zeigen sich insgesamt deutlich bessere Korrelationen für die Parameter des Akrosins als unter Beibehaltung aller Werte.

Die Mittelwerte für Halodurchmesser, Haloformationsrate und Akrosinaktivitäts Index in der Alternativmethode 3 lagen signifikant höher, als bei der Standardmethode der Gelatinolyse. Die entsprechenden Werte für die Alternativmethode 3 waren $43,6 \mu\text{m}$ ($\pm 2,2$), $75,4\%$ ($\pm 3,2$) und $34,5$ ($\pm 2,2$) verglichen mit $15,6 \mu\text{m}$ ($\pm 1,3$), $52,2\%$ ($\pm 4,5$) und $9,4$ ($\pm 2,2$) in der Standardmethode (Abb.29 A, B, C). Auch die Haloformationsrate (B) zeigte mit $75,4\%$ eine signifikante Zunahme zur alten Methode, wo sie bei $52,2\%$ lag (T-Test: $P=0,0001$). Dies konnte weder bei Alternativmethode 1 noch 2 beobachtet werden.

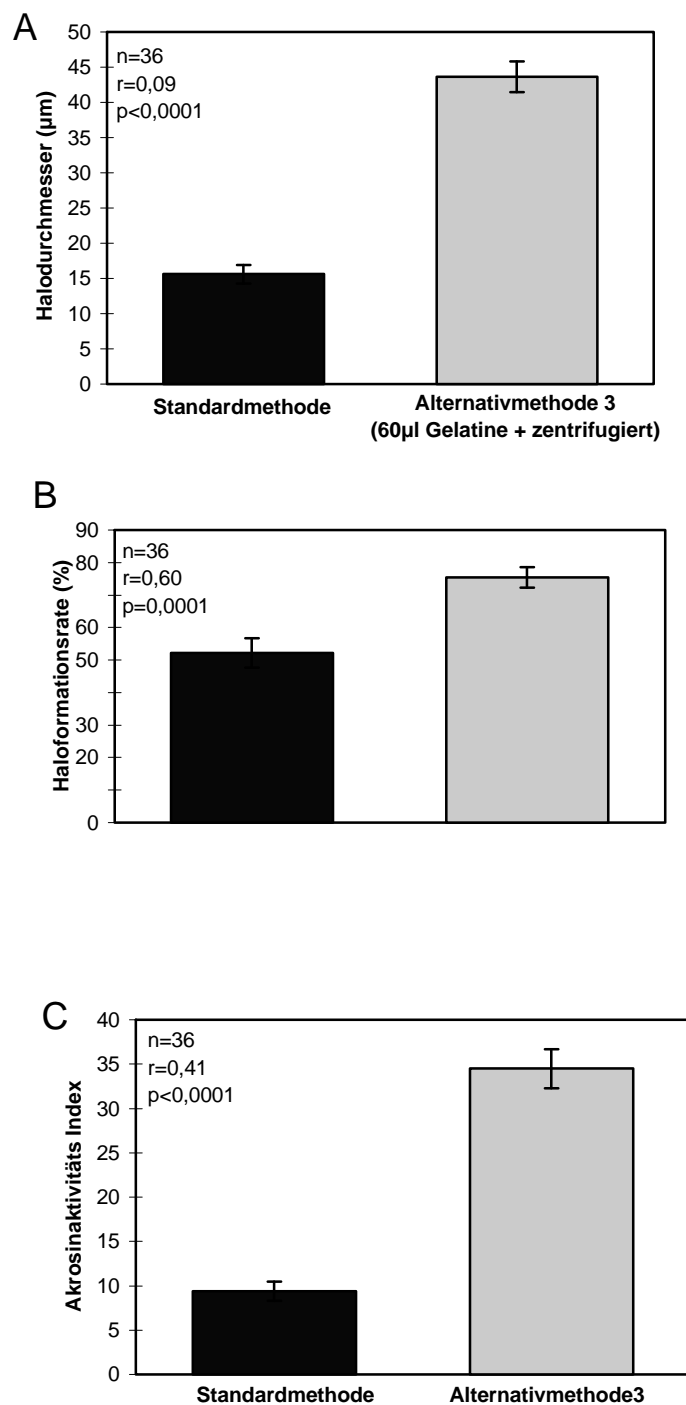


Abbildung 29: Vergleich des Halodurchmessers (A), der Haloformationsrate (B) und des Akrosinaktivitäts Index (C) der Standardmethode und der Alternativmethode 3; Für den Halodurchmesser und den Akrosinaktivitäts Index liegt die errechnete Irrtumswahrscheinlichkeit bei $P<0,0001$. Für die Haloformationsrate ist $P=0,0001$ (T-Test).

Insgesamt lagen Halodurchmesser und Akrosinaktivitäts Index in Alternativmethode 3) um ca. 100% höher als bei Modifikation 1 oder 2. Die Auswertung gestaltete sich hierbei auch einfacher, da die Halos sehr gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt waren.

Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die Mittelwerte (\pm SEM) von Halodurchmesser, Haloformationsrate und Akrosinaktivitäts Index der drei Modifikationen der Gelatinolysetechnik und der Standardmethode an.

Tabelle 10: Mittelwerte (\pm SEM) für Halodurchmesser, Haloformationsrate und Akrosinaktivitäts Index der drei verschiedenen Alternativmethoden der Gelatinolyse 1,2, 3 und der Standardmethode.

	Halodurchmesser (μ m)		Haloformationsrate (%)		Akrosinaktivitäts Index		Anzahl (n)
	m	\pm SEM	m	\pm SEM	m	\pm SEM	
Standardmethode	14,9	2,5	68,5	4,9	10,2	0,6	24
Alternativ Methode 1 (Zentrifugieren)	21,6	3,8	70,8	4,5	15,3	0,8	24
Standardmethode	15,0	5,3	58,8	3,4	9,9	0,7	58
Alternativ Methode 2 (60 μ l gelatine)	22,5	5,4	63,0	2,8	14,7	0,9	58
Standardmethode	15,6	1,3	52,2	4,6	9,4	1,1	36
Alternativ Methode 3 (Zentrifugieren+60 μ l)	43,6	2,2	75,4	3,2	34,5	2,2	36

Zur Überprüfung, ob auch ein Zusammenhang zwischen der leichter auswertbaren Alternativmethode 3 und der Fertilisationsrate in vitro besteht, wurde die so modifizierte Gelatinolysetechnik (Zentrifugation + 60 μ l Gelatine) bei 50 Aliquots von Ejakulaten untersucht, mit denen Eizellen in vitro fertilisiert wurden. Halodurchmesser (μ m), Haloformationsrate (%) und Akrosinaktivitäts Index wurden mit der Fertilisationsrate korreliert (Abb. 30A, B, C).

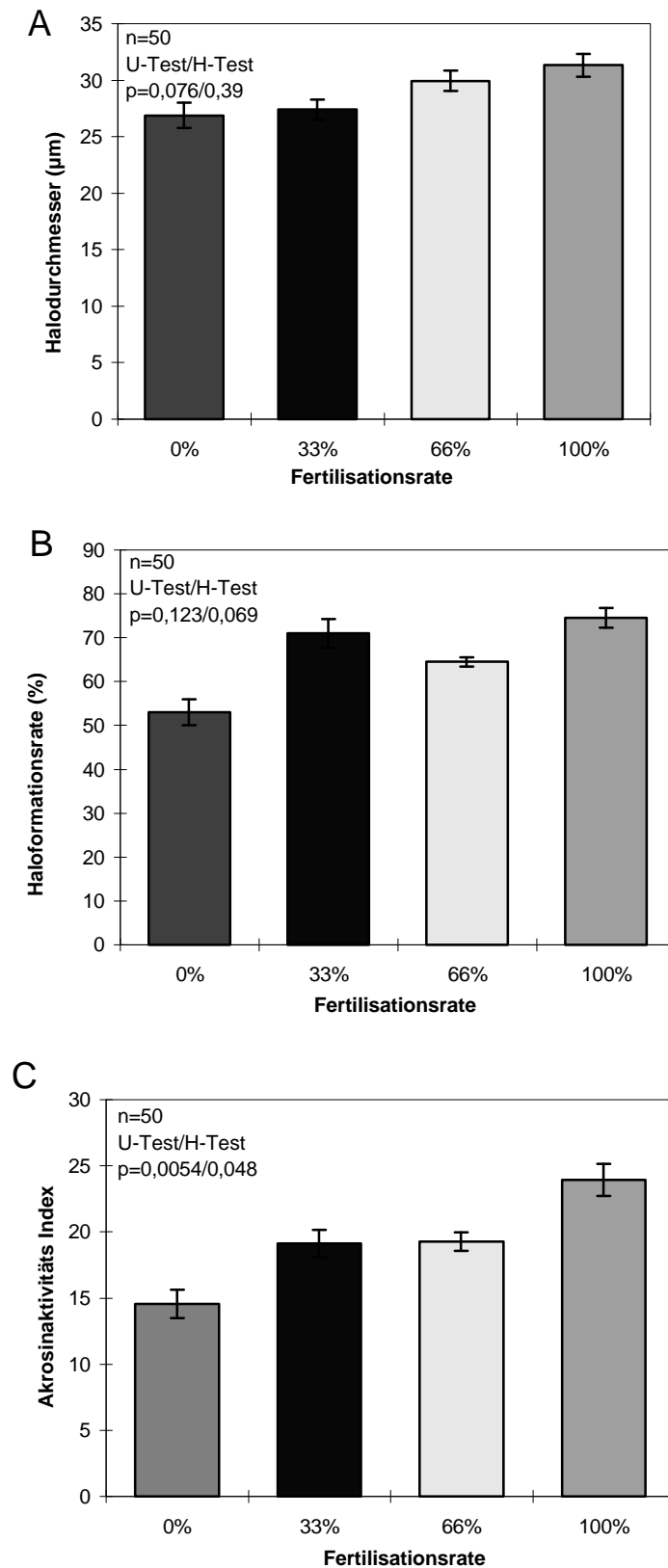


Abbildung 30: Korrelation von Halodurchmesser (A), Haloformationsrate (B) und Akrosinaktivitäts Index (C) von Alternativmethode 3 mit der Fertilisationsrate in vitro. Der Akrosinaktivitäts Index zeigt im Gegensatz zum Halodurchmesser und der Haloformationsrate einen signifikanten Zusammenhang mit der Fertilisationsrate (U-

Test/H-Test: $P=0,0054/0,048$). Es sind jeweils die Irrtumswahrscheinlichkeiten P für U-Test (A: $P=0,076$; B: $P=0,123$; C: $P=0,0054$) und H-Test (A: $P=0,39$; B: $P=0,069$; C: $P=0,048$) angegeben.

Beim Halodurchmesser (Abb. 30A) konnte nur ein geringer Anstieg zwischen den einzelnen Fertilisationsraten gesehen werden. Die mittleren Halodurchmesser der verschiedenen Gruppen betrugen 26,8 μm , 27,4 μm , 29,9 μm bzw. 31,3 μm . Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit hoher (>50%) und niedriger (<50%) Fertilisationsrate gefunden werden (U-Test: $P=0,076$; H-Test: $P=0,39$; $r=0,25$). Für die Haloformationsrate ergaben sich folgende Mittelwerte: 53%, 71%, 64,5% und 74,5%, die keine weitere Differenzierung zwischen den beiden Patientenkollektiven erlaubten (U-Test: $P=0,123$; H-Test: $P=0,069$; $r=0,34$). Dagegen konnte trotz eines relativ geringen Korrelationskoeffizienten ($r=0,39$), ein signifikanter Unterschied beim Akrosinaktivitäts Index zwischen der Patientengruppe mit den Fertilisationsraten 0% und 33% und derjenigen mit 66% und 100% festgestellt werden (U-Test: $P=0,0054$; H-Test: $P=0,048$; $r=0,39$). Die Mittelwerte des Akrosinaktivitäts Index der einzelnen Patientengruppen bei 0%, 33%, 66% und 100% betrugen 14,5, 19,1, 19,3, und 23,9.

4.5. Korrelation der verschiedenen Spermatozoenfunktionsparameter miteinander

Nach Korrelation der einzelnen Spermatozoenparameter untereinander, konnte lediglich zwischen dem Anteil B-G-Typ Spermatozoen im HOS-Test und der Akrosinaktivität im Pellet nach dem photometrischen Assay ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ($P=0,017$, $r=0,316$). Desweiteren konnte zwischen der Akrosinaktivität in Überstand+Pellet und der Spermatozoendichte ein signifikanter Zusammenhang ($P=0,003$; $r=0,345$) ermittelt werden.

5. DISKUSSION

Im Jahre 1940 legte WIESMANN, nach Beschreibung von ROSS (1983), erstmalig fest, daß die Grundlage jeder Ejakulatuntersuchung die Bestimmung von Ejakulatvolumen, Spermatozoendichte, -motilität und -morphologie sei. Diese Parameter werden heute als „klassische Spermatozoenparameter“ bezeichnet und sind modifiziert in den Richtlinien der WHO (World Health Organisation, 1987) aufgeführt. Sie stellen die Basisindikatoren der Samenanalyse zur Beurteilung männlicher Fertilität dar.

Bei den meisten Männern, welche eine Infertilitätssprechstunde aufsuchen, ist eine reduzierte Spermatozoendichte, -motilität oder -morphologie, meistens sogar Kombinationen dieser einzelnen Faktoren, zu finden. Etwa 25% der Infertilitätspatienten weisen jedoch normale Spermiogrammbefunde auf (MAC LEOD, 1971; LIU & BAKER, 1992a). Somit liefert die klassische Ejakulatuntersuchung nur unzureichende Information über das Fertilisationspotential der Spermatozoen (SIGMAN et al., 1991; HONIG et al., 1993). Zusammen mit den Fällen ungeklärter weiblicher Infertilität bilden diese Patienten das Kollektiv der idiopathischen Sterilität. Bei den Männern dieser Patientengruppe sind neben den herkömmlichen Spermatozoenparametern weitere Tests zur Untersuchung der Spermatozoenfunktion indiziert und können zu einer präziseren Diagnose des Sterilitätsfaktors führen. Mit den Funktionstests können die unterschiedlichen Stufen des Fertilisationsprozesses genauer untersucht werden (LIU & BAKER, 1992a; SCHILL et al., 1994). Einige davon können sowohl zur Vorhersage einer erfolgreichen Fertilisation in vivo oder in vitro dienen, als auch hilfreich bei der Auswahl des geeigneten Verfahrens für die assistierte Reproduktion sein. Desweiteren können die Spermatozoenfunktionstests eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Kontrolle männlicher Kontrazeptionsmethoden spielen (BARFIELD et al., 1979). Mit ihrer Hilfe können auch Einflüsse von Umweltgiften (z.B. Östrogene, Schwermetalle und Insektizide) auf die Spermatozoenfunktion getestet werden (GROW et al., 1994).

In dieser Arbeit wurden neben den klassischen Spermatozoenparametern auch die folgenden Funktionstests im Bezug auf die Fertilisation in vitro untersucht und deren Vorhersagewert diskutiert.

1. Computergestützte Motilitätsmessung
2. Hypoosmotischer Schwelltest
3. Akrosomreaktion
4. Akrosinaktivität

5.1. Klassische Spermatozoenparameter

5.1.1 Konzentration

Seit die verschiedenen Spermatozoenparameter näher untersucht werden, ist bekannt, daß die Spermatozoenkonzentration, trotz großer intraindividuelle Schwankungen, einen Bezug zur männlichen Fertilität aufweist (BELSEY et al., 1980). So gilt der Leitsatz: Hohe Spermatozoenzahlen bei fertilen Männern und niedrige bei infertilen (DAVID et al., 1979; Silber, 1989). Bei der Festsetzung der Normalwerte hat ein historischer Entwicklungsprozeß stattgefunden, wobei früher höhere Werte als „normal“ angesehen wurden (MACOMBER & SANDERS, 1929: $>60 \times 10^6/\text{ml}$; ELIASSON, 1975; WHO, 1987: $>20 \times 10^6/\text{ml}$; VAN ZYL, 1972; VAN ZYL et al., 1975; 1976: $>10 \times 10^6/\text{ml}$).

Wobei heute letztendlich der Wert der WHO (1987) von $20 \times 10^6/\text{ml}$ allgemein akzeptiert ist. Spermatozoenkonzentrationen $<20 \times 10^6/\text{ml}$ werden danach als Oligozoospermie, solche $>250 \times 10^6/\text{ml}$ als Polyzoospermie bezeichnet. Diese Patienten sind subfertil bzw. infertil. Abgesehen von diesen Normwerten, wird in Einzelfällen über Schwangerschaften subfertiler Paare mit sehr geringen Spermatozoenzahlen ($<1,0 \times 10^6/\text{ml}$) berichtet (BOSTOFTE et al., 1982; SCHOYSMAN & GERRIS, 1983; SOKOL & SPARKES, 1987). Entsprechendes zeigte sich auch während der Behandlung von Patienten mit Hypophyseninsuffizienz (BURGER & BAKER, 1984), in der Entwicklung männlicher Kontrazeptionsmethoden (BARFIELD, et al., 1979) und nach Vasektomie.

Tabelle 11: World Health Organization: Normwerte für Ejakulatparameter

Ejakulatparameter	Normwerte
Volumen	2,0-6,0 ml
Spermatozoenkonzentration	$\geq 20 \times 10^6$ Sp./ml
Motilität	$\geq 50\%$ Gesamtmotilität (Kategorie A und B) <u>o.</u> $\geq 25\%$ Progressivmotilität (Kategorie A)
Morphologie	$\geq 30\%$ Normalformen

WHO Klassifikation der Spermatozoenmotilität:

- A) schnelle progressive Beweglichkeit
- B) langsame oder träge progressive Beweglichkeit
- C) keine progressive Beweglichkeit
- D) Immotilität

(modifiziert nach: WHO Manual, 1987)

Auch Männer, die eine Polyzoospermie aufweisen, gelten als subfertil. Eine Erklärung dafür ist, daß die erhöhte Zellzahl häufig mit einer erniedrigten Akrosinaktivität und/oder verminderter Induzierbarkeit der Akrosomreaktion assoziiert ist (SCHILL & FEIFEL, 1984; TÖPFER-PETERSEN et al., 1987; SCHILL et al., 1988).

Die durchschnittliche Spermatozoenzahl im Ejakulat der Patienten, die in dieser Arbeit am IVF-Programm teilnahmen, lag bei $72,3 \times 10^6$ /ml. Trotz einer geringen Korrelation zur Fertilisationsrate konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der Fertilisation in vitro nachgewiesen werden. Als Grenzwert für eine erfolgreiche Fertilisation wurden 70×10^6 Spermatozoen/ml mittels ROC-Kurven Analyse ermittelt. Bei Unterschreiten dieses Wertes nimmt die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fertilisation deutlich ab. Dem Assay liegt eine hohe Spezifität (81,8%) bei relativ niedriger Sensitivität (45,6%) zugrunde. Somit sind geringe Spermatozoenkonzentrationen mit niedrigem Fertilisationspotential assoziiert (WOLF et al., 1984; HAMMADEH et al., 1997). Bei hohen Spermatozoendichten können

dagegen andere Parameter für eine geringe Fertilisation verantwortlich sein. Insbesondere der negative Vorhersagewert für den Parameter „Konzentration“ ist nicht sehr aussagekräftig (positiver Vorhersagewert: 88,7%; negativer Vorhersagewert: 32,4%), da neben der Spermatozoenkonzentration noch einige weitere Faktoren wie Motilität, Morphologie sowie verschiedene Funktionsparameter, auf die auch in dieser Arbeit eingegangen wird, das Fertilitätspotential der Spermatozoen bestimmen.

5.1.2. Motilität

Der zweite klassische Ejakulatparameter, welcher für die Befruchtung wichtig ist, stellt die Motilität dar. Neben dem passiven Transport der Spermatozoen innerhalb des Uterus ist eine gewisse Eigenbeweglichkeit nötig, damit die Spermatozoen durch den Zervikalmukus und den weiblichen Genitaltrakt bis zum Ort des Geschehens, der Tube, gelangen. Es wird ein spezielles Bewegungsmuster für die Cumulus- und Zonapenetration gefordert (DROBNIS et al., 1988a; 1988b). Männer mit ausschließlich immotilen Spermatozoen (Kartagener Syndrom) sind steril. Jedoch stellen diese Patienten sicherlich eine Minderheit im Feld männlicher Infertilität dar (AITKEN et al., 1983). Nach WHO-Kriterien gelten Männer deren Spermatozoen eine Gesamtmotilität <50%, bzw. eine Progressivmotilität <25% aufweisen (Tab. 12) als subfertil (BELSEY et al., 1980). Die Motilität bis hin zur Immotilität wird dabei in Grad A) bis D) eingeteilt. Alternativ kann auch, wie in dieser Arbeit, ein Score von 0-4 angewendet werden (s. 3.3, Material und Methoden).

Der Mechanismus der Generierung der Beweglichkeit im Cilien-Axonem von Säugerspermatozoen ist relativ gut untersucht. Obgleich Adenosin-Triphosphat (ATP) den Energielieferanten für die Bewegungen des Flagellums darstellt, ist eine erniedrigte ATP-Bildung wahrscheinlich nicht der Hauptgrund für die schlechte Beweglichkeit der Spermatozoen von Patienten mit Asthenozoospermie (LEVIN et al., 1981; LIU et al., 1987b). In einigen Fällen resultiert die Immotilität der männlichen Keimzellen aus strukturellen Defekten des Flagellums, die häufig die Mantelfasern, das Axonem oder die Mitochondrien betreffen (JADOT-VAN et al., 1980; WILLIAMSON et al., 1984; ZAMBONI, 1987; DADOUNE, 1988). Desweiteren haben auch Spermatozoenmortalität im Epididymis (WILTON et al., 1988), ein Mangel an Protein-Carboxy-Methylase (COOPER & BAKER, 1986) oder erhöhte

Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies negativen Einfluß auf die Motilität (AITKEN et al., 1991; KOVALSKI et al., 1992). Im Extremfall kann eine zu hohe Produktion reaktiver Sauerstoffspezies nicht nur zur völligen Immotilität führen, sondern auch andere Funktionsparameter wie die Zona- und Oolemmabindung erheblich einschränken (AITKEN & CLARKSON, 1988; HENKEL & SCHILL, 1998). Meistens bleibt jedoch die konkrete Ursache der verringerten Spermatozoenmotilität im Unklaren und es wird eine nichtspezifische Störung der Spermatogenese vermutet (LIU & BAKER, 1992a). ZAINI et al. (1985) fanden in einer umfangreichen Studie nur eine geringe Korrelation der Motilität mit der Fertilisation in vivo. Diese Autoren zeigten, daß eine Vorhersage der Fertilisation anhand der Motilität nur bei Männern mit einer Spermatozoenkonzentration $<5 \times 10^6/\text{ml}$ getroffen werden konnte. In mehreren Untersuchungen konnten LIU et al. ebenfalls nur geringe Korrelationen der Keimzellbeweglichkeit mit dem IVF-Programm feststellen (LIU et al., 1987a; 1988a; 1989a; 1989b; LIU & BAKER, 1988; 1990). In der vorliegenden Arbeit lag die durchschnittliche Gesamtmotilität im Nativejakulat bei 52,8% und die Progressivmotilität entsprach einem Score von 3. Die entsprechenden Werte nach Aufbereitung mittels Swim up waren, wie zu erwarten, höher und lagen bei 84% Gesamtmotilität, der Score für die Progressivmotilität lag bei 3,5. Somit zeigte die Mehrzahl der Spermatozoen eine schnelle und lineare Progressivbewegung. Für die Gesamtbeweglichkeit konnte, im Gegensatz zur Progressivmotilität, sowohl vor als auch nach Aufbereitung ein signifikanter Zusammenhang mit der Fertilisationsrate ermittelt werden ($P=0,0319$). Mittels ROC-Kurven-Analyse konnte im Nativejakulat für die Gesamtmotilität ein Grenzwert von 60% und ein Score für die Progressivmotilität von 2,5 errechnet werden. Die entsprechenden Werte nach Aufbereitung mittels Swim up-Verfahren lagen bei 88% und 3. Bei Überschreiten dieser Werte nahm die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fertilisation ($>50\%$) deutlich zu. Auffallend war die für ein biologisches System recht gute Korrelation zwischen den progressiv motilen Spermatozoen nach Swim up und der Fertilisationsrate ($r=0,526$).

Um eine bessere Quantifizierung und objektivere Beurteilung der Motilität zu erreichen sowie deren diagnostische Vorhersagekraft zu optimieren, wurden spezielle Computersysteme zur computerassistierten Spermatozoenanalyse (CASA) entwickelt. Diese Technologie basiert auf digitalisierten Spermatozoenbildern, welche mittels Videokamera sichtbar gemacht werden und per Computer analysiert werden.

Die verschiedenen Geschwindigkeitsparameter „Progressivgeschwindigkeit“ (VSL), „Spurgeschwindigkeit“ (VCP) und „Pfadgeschwindigkeit“ (VAP), sowie die „seitliche Kopfauslenkung“ (LHD) wurden gemessen. Entsprechend der Ergebnisse von AITKEN, (1989), konnte hier eine positive Korrelation zwischen LHD ($r=0,27$; $P=0,013$) und VAP ($r=0,22$; $P=0,045$) mit der Fertilisationsrate bestätigt werden. Auch JEULIN et al. (1986) zeigten, daß die laterale Kopfauslenkung der motilen Spermatozoen nach Swim up-Technik mit den Resultaten des IVF-Programms positiv korrelierten. LIU & BAKER (1992a) ermittelten einen Zusammenhang von Dichte, Motilität, Linearität und VSL mit der Fertilisationsrate. In dieser Arbeit konnte keine signifikante Korrelation der beiden letztgenannten Parameter mit der Fertilisationsrate in vitro festgestellt werden.

Für die Beurteilung des Nutzens der CASA ist es erforderlich zu überprüfen, ob die Standardejakulatparameter wie Konzentration und Motilität mit diesem System exakt bestimmt werden können. VANTMAN et al. (1988) verglichen die Ergebnisse für Konzentration und Motilität der manuellen Samenanalyse und der CASA. Sie ermittelten, daß die Computeranalyse die Spermatozoendichte um 30% zu hoch angab, wenn sehr geringe Spermatozoenzahlen gemessen wurden. Bei Patienten mit Azoospermie kalkulierte die CASA einen mittleren Wert von $3,6 \times 10^6$ Spermatozoen/ml. Desweiteren erbrachte die Computeranalyse bei hohen Spermatozoendichten einen zu geringen Anteil motiler Zellen. Bessere Korrelationen zwischen manueller Analyse und CASA ergaben sich bei der Untersuchung gewaschener oder mittels Swim up aufbereiteter Spermatozoen (VANTMAN et al., 1988; MORTIMER, 1994).

Weitere Nachteile dieses Systems bestehen in der schwer zu standardisierenden Probenaufbereitung, den relativ hohen Kosten, in der nötigen technischen Erfahrung und des entsprechenden Wissensstandes über die Grenzen dieser computergestützten Untersuchung. Fehler treten relativ häufig, wie schon erwähnt, bei zu hoher oder niedriger Spermatozoenzahl auf (VANTMAN et al., 1988). Bei richtiger Handhabung kann der Computer allerdings Vorteile gegenüber der manuellen Methode aufweisen. Es können verschiedene Variablen untersucht werden, die in der routinemäßigen Samenanalyse nicht bestimmt werden können. In manchen Fällen können Abnormalitäten der Spermatozoenfunktion demonstriert werden. So konnten De LAMIRANDE und GAGNON (1993) spontane hyperaktivierte Bewegungen in Ejakulaten mit idiopathischer Sterilität beobachten. Dies war mit einer

niedrigen Aktivität der Superoxiddismutase im Seminalplasma assoziiert. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um die Spermatozoenbewegung für eine aussagekräftige Diagnostik genau zu charakterisieren.

5.1.3. Morphologie

Die Morphologie ist der dritte der klassischen Spermatozoenparameter. Seit Anfang dieses Jahrhunderts hat die morphologische Beurteilung der Spermatozoen an Bedeutung gewonnen und es wurde akzeptiert, daß sowohl normale als auch pathologische Formen gleichzeitig in einer Ejakulatprobe vorkommen können (HOTCHKISS, 1945; JOEL, 1971). Im Jahre 1916 faßte CARY die existierende Literatur erstmals zusammen und fügte darüber hinaus schematische Zeichnungen von atypischen Spermatozoen ein. Er assoziierte auch als erster abnormale Spermatozoenmorphologie mit dem Fertilisationspotential eines Mannes. Fortschritte in der Beurteilung der Spermatozoenmorphologie wurden möglich durch die Entwicklung neuer Färbemethoden (WILLIAMS & SAVAGE, 1925; WILLIAMS et al., 1934; WILLIAMS, 1937; PAPANICOLAOU, 1942; AMELAR et al., 1973) und der Einführung bestimmter Klassifikationen entsprechend der beobachteten Abnormalitäten der Spermatozoen (MOENCH & HOLT, 1931; CARY & HOTCHKISS, 1934). WILLIAMS et al. (1934) teilte das Spermatozoon in die vier Abschnitte Kopf, Hals, Mittelstück und Schwanz ein und beschrieb als erster das Akrosom. Darüber hinaus klassifizierte er die männlichen Gameten in sechs morphologische Gruppen. Im Jahre 1952 publizierten MACLEOD & GOLD ein ebenso aus 6 Gruppen bestehendes Klassifikationssystem. In späteren Artikeln führte MACLEOD (1964, 1966) Spermatozoenvorstufen als 7. Gruppe ein, welche kennzeichnend für pathologische Prozesse im Testis sind. FREUND (1966) faßte in einem "Review" die unterschiedlichen Methoden zur Beurteilung der Spermatozoenmorphologie als chaotische Situation zusammen. Es bestand kein Konsens über das „Wie“ der Beurteilung und es gab auch keine Übereinstimmung welche Spermatozoen als normal bezeichnet werden sollten. Darüber hinaus wurde keine einheitliche Färbemethode, Präparation der Objektträger und mikroskopische Vergrößerung zur Beurteilung der Spermatozoen angewendet. Er klassifizierte den Spermatozookopf in 6 Gruppen, fügte separat Schwanzdefekte ein und die Beurteilung von Spermatozoenvorstufen. Auch ELIASSON (1971) modifizierte die 6 Basisgruppen von MACLEOD, indem er Hals-, Mittelstück- und Schwanzabnormalitäten

miteinschloß. Er konstatierte, daß das gesamte Spermatozoon beurteilt werden muß und definierte das „normale Spermatozoon“. Desweiteren führte er die Einteilung der Gameten nach der Größe, wie zu kurz, zu klein, zu groß und elongiert ein. Im Jahre 1980 erschien das erste WHO-Handbuch mit der Grundbeschreibung der Evaluierung der Spermatozoenmorphologie. Die Klassifizierung basierte auf dem von MACLEOD (1970) beschriebenen System unter besondere Berücksichtigung der Precursorzellen. Im WHO-Handbuch von 1992 wurde der Spermatozoenmorphologie größere Aufmerksamkeit gewidmet. Neue Richtlinien entsprachen der Einteilung nach strikten Kriterien (MENKVELD 1987; MENKVELD et al., 1990), wobei auch nur geringfügig abnormale Spermatozoen als abnormal eingestuft wurden (MENKFELD & KRUGER; 1990; MENKVELD et al., 1991). Es wurde lediglich zwischen 5 Gruppen unterschieden und ein Teratozoospermieindex wurde eingeführt (GROW et al., 1994). Ebenso wurden spezielle Sterilitätsdefekte, wie Rundkopfspermatozoen erwähnt. Diese auch als Globozoospermie bezeichnete Fehlformen, ohne Ausbildung von Akrosomen, können weder in vitro noch in vivo Oozyten fertilisieren (JEYENDRAN et al., 1985; LALONDE et al., 1988; SCHILL et al., 1988; VON BERNHARDI et al., 1990). Die „Düsseldorfer Klassifikation“ (HOFMANN et al., 1985; HOFMANN & HAIDER; 1985; HOFMANN, 1987) legte dagegen eine stärkere Gewichtung auf die Beurteilung elongierter Spermatozoen und akrosomaler Defekte. Es wurde zwischen normaler Kopfform und 3 Graden von Elongationen des postakrosomalen Bereichs unterschieden. Desweiteren wurden Veränderungen im akrosomalen Teil klassifiziert und es wurde in drei verschiedene Schwanzdefekte unterteilt. Darüber hinaus wurde das unterschiedliche Färbeverhalten mit dem Nachweis von Veränderungen des Schwanzschafte mittels Shorr Färbung (HAIDL & SCHILL, 1993) ermittelt.

KATZ et al. (1982) beschrieben, daß morphologisch normal geformte Spermatozoen sich schneller, geradliniger und mit größerer Schlagfrequenz bewegten.

Im Jahre 1986 untersuchten KRUGER et al. die Spermatozoenmorphologie nach „strikten Kriterien“. Sie konnten sehr gute Korrelationen mit der Fertilisationsrate im IVF-Programm erzielen (BAKER, 1988; KRUGER, et al., 1988a; 1988b; LIU et al., 1988a; LIU & OEHNINGER, 1988b; 1992; O'SHEA et al., 1993). Diese strikten „Tygerberg Kriterien“ als prognostischer Vorhersagewert für die Fertilisation wurden bisher als einzige Beurteilung der Spermatozoenmorphologie mit der Fertilisation als Kriterium im IVF-Programm evaluiert. Andere Arbeitsgruppen konnten die guten

Vorhersagewerte bestätigen (OEHNINGER et al., 1988a; ENGINSU et al., 1991; MORGENTALER et al., 1993). Bei einem Anteil von mehr als 15% morphologisch normal geformten Spermatozoen lag die Fertilisationsrate bei 82,5%. Bei Unterschreiten von 14% normal geformten Spermatozoen zeigte sich ein drastischer Abfall der Fertilisationsrate auf 37%. Von KRUGER et al. (1988a) wurde eine weitere Unterteilung eingeführt, mit Differenzierung der Patienten in solche mit guter Prognose hinsichtlich einer erfolgreichen Fertilisation mit 5%-14% normal geformten Spermatozoen und solche mit schlechter Prognose bei weniger als 4% normal geformten Spermatozoen. Es wurde eine Reihe vergleichender Studien zwischen den strikten Kriterien und den 1987 publizierten Richtlinien der WHO durchgeführt. Nach OEHNINGER et al. (1988b) und ENGINSU et al. (1991) sind die Tygerberg Kriterien den WHO Kriterien hinsichtlich der Vorhersage der zu erwartenden Fertilisation überlegen.

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen die Beurteilungskriterien der Spermatozoenmorphologie nach WHO (1987) anhand der Fertilisation als Parameter zu evaluieren. Nach WHO-Kriterien gilt ein Patient mit <30% morphologischen Normalformen im Ejakulat als subfertil (Teratozoospermie). Generell ist anzumerken, daß fertile Männer mehr morphologische Normalformen als infertile aufweisen (BOSTOFTE et al., 1985).

Wie bei ZAINI et al. (1985) und BAKER et al. (1985) ergab sich in dieser Arbeit kein signifikanter Zusammenhang zwischen der nach WHO-Kriterien bestimmten Morphologie und der Fertilisationsfähigkeit ($r=0,293$; $P=0,0826$). Diese Feststellung wird durch die Arbeiten von CHECK et al. (1992) und COMHAIRE et al. (1994) erhärtet. In einer Studie von MC GOWAN (1983) jedoch unterschieden sich bei Donorinseminationen die Schwangerschaftsraten zwischen Spermatozoen mit guter bzw. schlechter Morphologie. Im Hamster-Ovum Penetrationstest (HOP-Test) konnten Spermatozoen mit einem höheren Anteil morphologischer Defektformen schlechter das Oolemma penetrieren (ROGERS et al., 1983; SHALGI et al., 1985; MARSH et al., 1987). Es besteht somit eine negative Korrelation zwischen dem Anteil morphologisch fehlgeformter Spermatozoen und der Penetration des Oolemmas im HOP-Test (SHALGI et al., 1985; MARSH et al., 1987; KRUGER et al., 1988c). MENKVELD et al. (1991) sowie LIU und BAKER (1992b) zeigten, daß die menschliche Zona pellucida selektiv normalgeformte Spermatozoen bindet. Nach

MAKLER (1988) ist innerhalb der motilen Subpopulation von Spermatozon die Beurteilung der Morphologie aussagekräftiger. Darüber hinaus sollen bei immotilen Spermatozoen etwa doppelt so viele morphologische Fehlformen auftreten. Daran anknüpfend konstatieren einige Autoren, daß die Spermatozoen nach Swim up- oder Percoll-Aufbereitung eine bessere Morphologie als im Nativejakulat aufweisen (POUSETTE et al., 1986; ANDOLZ et al., 1987; LE LANNOU & BLANCHARD, 1988). Diese Aussage kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht unterstützt werden. So lag der Anteil morphologischer Normalformen im Nativsperma bei 54,2% und nach Swim up bei 56% nur unwesentlich höher. Der Zusammenhang mit der Fertilisationsrate war zwar etwas besser ($P=0,052$ im Vergleich zu $P=0,0826$), doch das Signifikanzniveau konnte nicht erreicht werden. Anhand der vorliegenden Daten eignet sich die Beurteilung der Morphologie nach WHO-Kriterien nicht zur Vorhersage der Fertilisation in vitro. Dies unterstützt die Daten der Literatur, daß die „Tygerberg Kriterien“ vorzuziehen sind.

Sicherlich treten in der subjektiven mikroskopischen Beurteilung der Spermatozoenmorphologie von Labor zu Labor Schwankungen auf und falschpositive und -negative Resultate sind zu verzeichnen (BAKER & CLARKE, 1987). Entscheidend ist, daß jedes Labor seine eigenen Standard- und Qualitätskontrollen durchführt, da gerade die Beurteilung der Morphologie sehr subjektiv ist und große interindividuelle Schwankungen auftreten können (BAKER & CLARKE, 1987). Dies macht deutlich, daß ein einheitlich akzeptiertes und standardisiertes Verfahren zur objektiven Klassifizierung etabliert werden müßte (KATZ et al., 1986; MORUZZI et al., 1988). Erste und sehr vielversprechende Schritte in diese Richtung sind die Entwicklung computerassistierter Spermatozoen-Morphologie-Analysen. Hiermit könnte sich die Beurteilung der Spermatozoenmorphologie vom äußerst subjektiven Test zu einer präzisen und akuraten Messung per Computer entwickeln. Anfängliche klinische Erfahrungen haben Genauigkeit und Reproduzierbarkeit mit der manuellen Methode gezeigt (KRUGER et al., 1993, 1995, 1996; LACQUET et al., 1996; MENKVELD et al., 1997). DUNCAN fand 1993 bei der Korrelation der Fertilisationsraten und der kombinierten Indices von Motilität und Morphologie derjenigen Spermatozoenproben, die für die IVF verwendet wurden, einen signifikanten Zusammenhang. In 294 IVF-Zyklen konnten 95% der Patienten mit guter Fertilisation und 77% mit geringer Fertilisation

vorausgesagt werden. Mittels multipler Regression wurde auch in dieser Arbeit bei Kombination der Werte für Dichte, Morphologie, Motilität und Progressivmotilität der Ejakulatproben ein hochsignifikanter Zusammenhang mit der Fertilisationsrate festgestellt ($P < 0,0001$). Nach Swim up-Aufbereitung war das Signifikanzniveau deutlich geringer ($P = 0,019$).

Insgesamt konnten in der hier vorliegenden Arbeit mittels ROC-Kurven Analyse die Grenzwerte für Dichte, Motilität, Progressivmotilität und Morphologie bei $70 \times 10^6/\text{ml}$, $>60\%$, $>2,5$ (Score 0-4) und $>50\%$ ermittelt werden. Die entsprechenden Werte nach Swim up-Verfahren lagen bei $>6,4 \times 10^6/\text{ml}$, $>55\%$, >3 und $>88\%$. Bei Überschreiten dieser Grenzwerte kann in 95% der Fälle mit einer erfolgreichen Fertilisation gerechnet werden. Die Spezifität der Bestimmung der Dichte (81,8%) und Motilität (84,1%) zeigt relativ hohe Werte, bei niedriger Sensitivität (45,6%; 40,6%). Eine Ausnahme hierbei bildet der ermittelte Grenzwert für die Progressivmotilität nach Swim up mit hoher Sensitivität (89%) und geringer Spezifität (19,1%) bei relativ hohem Korrelationskoeffizienten ($r = 0,526$). Dies bedeutet, daß trotz Überschreiten der Grenzwerte eine geringe Fertilisation ($<50\%$) auftreten kann. Dies spiegelt sich auch in den geringen Korrelationskoeffizienten ($r \approx 0,3$) aller Einzelparameter mit der Fertilisationsrate wieder. Die geringe Fertilisation deutet in diesen Fällen auf einen anderen Parameter hin, der in der Befruchtungskaskade suboptimal ist.

5.2. Hypoosmotischer Schwelltest

Semipermeabilität ist eine fundamentale biophysikalische Eigenschaft aller biologischen Membranen und damit lebender Zellen. Es ist bekannt, daß die Zellmembran den Transport bestimmter Flüssigkeiten und Moleküle ermöglicht. Im Jahre 1984 beschrieben JEYENDRAN et al., daß unter hypoosmotischen Bedingungen (150 mOsmol/l) Spermatozoen, als lebende Zellen, Flüssigkeit aufnehmen, welches ein Anschwellen der Plasmamembran und Zusammenrollen der Flagellen bewirkt. Dieser Test basiert auf der Resistenz vitaler Zellen gegenüber osmotischen Gradienten, im Kontrast zu avitalen Zellen. Unter hypoosmotischen Bedingungen erfolgt ein Flüssigkeitstransport entlang der intakten Plasmamembran bis ein Ausgleich zwischen dem Zellinneren und der Umgebung der Zelle erreicht ist (SONG et al., 1991). Die funktionelle Integrität der Plasmamembran des Spermatozoons konnte so mit dem einfach durchzuführenden HOS-Tests beurteilt

werden. Die Autoren beschreiben, daß sich beim Schwellen der Plasmamembran unter hypoosmotischen Bedingungen diese im Bereich des Flagellums einrollt. Freier Raum entsteht zwischen Spermatozoonkopf und Flagellum. Wenn die Schwanzfasern unter Spannung stehen, bewirkt der überflüssige Raum, daß sie sich innerhalb der Membran aufrollen (ZANEVELD & JEYENDRAN, 1988). Tote Spermatozoen oder Gameten mit gestörter Membranfunktion weisen dieses Schwellungsphänomen nicht auf. Somit mißt dieser Test die physikalische und funktionelle Integrität der Plasmamembran und damit die Vitalität der männlichen Keimzelle (AVERY et al., 1990; JEYENDRAN et al., 1992). Mit Antikörpern gegen die äußere akrosomale Membran porciner Spermatozoen und indirekter Immunfluoreszenz unter hypoosmotischen Bedingungen konnte das Schwellungsverhalten auch im Spermatozoonkopf demonstriert werden. Dieses Experiment zeigt die Expansionsfähigkeit der Plasmamembran im akrosomalen Bereich als auch die Spezifität dieses Antiserums für die äußere akrosomale Membran (SÁNCHEZ et al., 1993).

Als Normalwerte gelten im Ejakulat $\geq 60\%$ geschwollene Spermatozoonflagellen. Die Grauzone, in der keine eindeutige Diagnose gestellt werden kann, liegt zwischen 50-59% und bei unter 50% handelt es sich um pathologische Werte (VAN DER VEN, 1986). In der Literatur wurden die Ergebnisse des HOS-Tests mit verschiedenen Spermatozoonfunktionsparametern korreliert: Spermatozoon-Konzentration, Motilität, Morphologie, HOP-Test und Vitalität (Eosintest). Diese und die entsprechenden Resultate der Korrelationen des HOS-Tests mit Spermatozoonkonzentration, Motilität und Morphologie in dieser Arbeit sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Die Korrelation zwischen den verschiedenen Parametern mit dem HOS-Test weisen bei den verschiedenen Autoren deutliche Schwankungen auf. Zusammenfassend sind die relativ geringen Korrelationskoeffizienten Ausdruck dafür, daß der Fertilisationsprozeß ein multifaktoriell determiniertes Ereignis ist. Mit der Vitalität kann ein deutlicherer Zusammenhang gesehen werden ($r=0,47-0,76$), da diese in letzter Konsequenz mit dem HOS-Test gemessen wird. VAN DEN SAFFELE et al. (1992) schließen aus ihren Ergebnissen, daß der HOS-Test die gleiche Information wie die Vitalitätsprüfung mittels Eosin liefert. SCHRADER et al. (1983) dagegen beurteilen dies differenzierter. Der Eosin-Test gibt ihrer Ansicht nach in erster Linie Aufschluß

über die physikalische Integrität der Plasmamembran, der HOS-Test über deren Funktionsfähigkeit.

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen dem HOS-Test und anderen Spermatozoenparametern (angegeben sind die jeweiligen Korrelationskoeffizienten r).

Autoren	Sperm. konz. (10^6 Sp/ml)	Motilität (%)	Morphologie (%)	Vitalität (%)	HOP-Test (%)
Jeyendran et al. (1984)	—	0,61	0,30	0,52	0,90
Chan et al. (1985)	0,02	0,22	0,32	—	0,05
Wang et al. (1988)	0,19	0,60	0,41	—	0,41
Chan & Wang (1987)	—	0,33	0,14	—	0,08
Chan et al. (1988)	—	0,41	0,10	—	0,04
Coetze et al., (1989)	—	—	0,51	0,76	0,42
Rogers & Parker, (1991)	0,48	0,51	0,26	—	0,32
van Kooij et al., (1986)	—	—	—	0,70	—
Liu et al., (1988a)	0,23	0,48	0,25	0,47	—
van den Saffele et al., (1992)	—	0,54	—	0,50	—
Takahashi et al., (1990)	—	—	—	—	0,40
Oosterhuis et al., (1996)	0,299	0,405	—	—	0,421
diese Arbeit	0,293	0,496	0,386	—	—

HOP-Test=Hamster Ovum Penetrationstest.

In dieser Arbeit, wie auch bei anderen Arbeitsgruppen (s. Tab. 12), zeigte sich die beste Korrelation mit der Motilität der Spermatozoen ($r=0,496$). Diese relativ gute Korrelation mit dem HOS-Test läßt sich u.a. darauf zurückführen, daß für die Motilität eine funktionell intakte Plasmamembran entscheidend ist.

JEYENDRAN et al. (1984) beschrieben als erste eine hohe Korrelation des HOS-Tests mit dem HOP-Test. Sie schlossen daraus, daß der Assay ein einfacher klinischer Test zur Untersuchung der menschlichen Spermatozoenfunktion sei. Im Gegensatz dazu fanden andere Autoren einen geringen oder keinen signifikanten Zusammenhang, v.a. bei Untersuchung großer Patientenzahlen. Der HOS-Test wurde jedoch weiterhin als ein zusätzlicher Indikator bei der Untersuchung männlicher Subfertilität herangezogen (SMITH et al., 1992). Darüber hinaus wurde dieser angewendet, um die Spermatozoen im Rahmen der Selektion und Präparation (HUSZAR et al., 1988) für die assistierte Reproduktion zu beurteilen sowie deren Vitalität nach Kryokonservierung zu bestimmen (CENTOLAI et al., 1988). Desweiteren können auch Auswirkungen von Toxinen auf die Spermatozoen

untersucht werden (SMITH et al., 1992). Der HOS-Test wurde mit der Motilität kryokonservierter Spermatozoen korreliert. Die Supravitalfärbung und der Anteil HOS-positiver Spermatozoen vor dem Frieren der Proben konnten jedoch die Motilität der aufgetauten Spermatozoen nicht voraussagen.

Der HOS-Test wurde wiederholt in der andrologischen Diagnostik eingesetzt, jedoch ohne Evaluierung des Testsystems. Um eine Aussage über das Fertilisationspotential treffen zu können, wurde der HOS-Test deshalb in dieser Arbeit aufgegriffen und im IVF-Programm der Gießner Frauenklinik evaluiert. Es wurden somit anhand der Fertilisation als Kriterium „cut-off values“ für den HOS-Test ermittelt. Mittels ROC-Kurven Analyse wurde zur Vorhersage der Fertilisation in vitro für den Anteil aller geschwollener Spermatozoen (B-G Typ) ein Grenzwert von 63% und für den Anteil G-Typ geschwollener Spermatozoen einer von 19% ermittelt. Dies unterstreicht die Ergebnisse von VAN DER VEN et al. (1986), welche den Grenzwert für Erstgenannte bei 60% festlegten. Bei Überschreiten dieser Werte nimmt die Wahrscheinlichkeit des Eintritts einer erfolgreichen Fertilisation deutlich zu. Daneben zeigten einige andere Publikationen eine hohe Korrelation mit der in vitro Fertilisation (CHECK et al., 1989; JEYENDRAN et al., 1992; MORDEL et al., 1993). Für die in dieser Arbeit ermittelten Grenzwerte errechnete sich eine relativ geringe Spezifität (52,6%) bei hoher Sensitivität (83,3%). Der positive Vorhersagewert lag bei 76,9% und der negative bei 62,5%. Die vergleichsweise hohe Sensitivität unterstreicht die besondere Bedeutung der Membranintegrität als Spermatozoenfunktion. Dies macht deutlich, daß ein geringer Anteil geschwollener Flagellen im HOS-Test eine geringe Fertilisationsfähigkeit mit sich bringt, während ein normales Resultat nicht zur Vorhersage einer erfolgreichen Fertilisation geeignet ist (DE CASTRO et al., 1990; JEYENDRAN et al., 1992). In diesem Fall können andere Faktoren, z.B. andere Spermatozoenfunktionsparameter, das Ausbleiben einer erfolgreichen Fertilisation bewirken. Somit wird auch hier wieder deutlich, daß es sich beim Fertilisationsprozeß um ein multifaktoriell determiniertes Geschehen handelt. Differenziert man zwischen „fertilen“ und „infertilen“ Patienten ergibt sich für die entsprechenden Grenzwerte bei den B-G-Typ Spermatozoen eine maximale Spezifität und positiver Vorhersagewert (100%), bei relativ niedriger Sensitivität (56,8%) und negativem Vorhersagewert (36,7%). Für die G-Typ Spermatozoen waren die Werte entsprechend nicht ganz so hoch, doch zeigte sich auch eine relativ hohe Sensitivität (81,8%). Somit kann bei

Überschreiten der jeweiligen Grenzwerte mit hoher Wahrscheinlichkeit eine erfolgreiche Fertilisation erwartet werden.

RIEDEL et al. (1989) zeigten, daß bei Penetrationsraten im HOP-Test über 40% und einem Anteil geschwollener Spermatozoen von über 65% der Eintritt einer erfolgreichen Fertilisation sehr wahrscheinlich sei, auch wenn andere Samenparameter im pathologischen Bereich lagen. Diese Autoren schlossen daraus, daß die Fertilität generell mit einem positiven HOS-Test assoziiert ist. Andere Autoren gehen jedoch von keinerlei Vorhersagekraft des HOS-Tests bezüglich der Fertilisation aus (BARRAT et al., 1989; SJOBLÖM & COCCIA, 1989; AVERY et al., 1990; CHAN et al., 1990). BARRAT (1989) berichtete über ein gehäuftes Auftreten falsch positiver Werte bei der Durchführung des HOS-Testes. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (s. o.: Spezifität, Sensitivität).

Nach Meinung anderer Arbeitsgruppen liefert der HOS-Test zwar Hinweise für ein besseres Verständnis der Physiologie der Spermatozoenmembran, jedoch soll er, verglichen mit den anderen Funktionstests, keinen entscheidenden Vorteil bringen, um die Erfolgsrate in vivo oder in vitro vorhersagen zu können (SIGMAN et al., 1991; LIU & BAKER, 1992a; BUCH, 1993).

CHECK et al. (1995) beschrieben, daß ein geringer Anteil HOS-positiver Spermatozoen keinen Einfluß auf die Fertilisationsrate der Oozyten oder auf die Anzahl der transferierten Embryonen im IVF-Programm habe, jedoch mit einer niedrigen Schwangerschaftsrate assoziiert sei und somit zur Entwicklung defekter Embryonen führe. Bei einem HOS-Test unter 50% käme es nicht zu einer natürlichen Schwangerschaft (CHECK et al., 1996). Darüber hinaus war aber die Fertilisationsrate bei diesen Patienten im IVF-Programm nicht signifikant erniedrigt. Jedoch war die Implantation und Weiterentwicklung der Embryonen deutlich reduziert.

Nach TAKAHASHI et al. (1990) sollte der Anteil der G-Typ Spermatozoen im Ejakulat als Fertilitätsindex ausreichen. Dies konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Der Korrelationskoeffizient zwischen B-G-Typ und G-Typ Spermatozoen lag mit $r=0,67$ unter dem von TAKAHASHI ermittelten Wert ($r=0,913$). Ebenso konnte für den Anteil aller geschwollener Spermatozoen eine bessere Korrelation und Signifikanz mit der Fertilisationsrate beobachtet werden. Auffallend war ein glockenförmiger Verlauf der kumulativen Verteilungskurve beider Parameter

mit deutlicher Linksverschiebung der Patienten mit einer Fertilisationsrate $<50\%$ zu niedrigeren Werten hin. Bei einem Anteil geschwollener Spermatozoen vom B-G-Typ unter 50% bzw. weniger als 10% G-Typ Spermatozoen konnten keine Patienten mit einer Fertilisationsrate $>50\%$ gefunden werden. Am deutlichsten unterschied sich der Anteil der Spermatozoen vom B-G-Typ und G-Typ zwischen infertilen und fertilen Patienten (U-Test: $P < 0,0001$ bzw. $P < 0,0008$). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit können vor allem positive Ergebnisse, d.h. Werte für B-G-Typ geschwollene Spermatozoen von $>63\%$ oder für G-Typ Spermatozoon von $>19\%$, zur Vorhersage einer erfolgreichen Fertilisation herangezogen werden.

Trotz der vielen kontroversen Meinungen sollte der HOS-Test, auch wegen seiner einfachen, zeitsparenden und kostengünstigen Durchführbarkeit, in Kombination mit anderen Spermatozoonfunktionsparametern zur Beurteilung des Fertilisationspotentials herangezogen werden. Der HOS-Test sollte jedoch immer im Zusammenhang mit anderen Parametern gesehen werden. Bei dem Vergleich mit den sonst gängigen Funktionstests zeigt er eine entsprechende positive Korrelation mit der Fertilisationsrate. Dies ist wiederum Ausdruck dafür, daß der Fertilisationsprozeß ein multifaktoriell determiniertes Ergebnis ist.

5.3. Akrosomreaktion

Neben den klassischen Spermatozoenparametern und der Membranintegrität spielt die Akrosomreaktion im Fertilisationsprozeß eine entscheidende Rolle. Das Akrosom ist ein membrangebundenes Organell, das während der Spermatogenese aus dem Golgi Apparat entsteht. Patienten, deren Akrosom nicht vollständig ausgebildet ist oder sogar fehlt, gelten als sub- bzw. infertil (SCHILL et al., 1988; SCHILL, 1991). Rundkopfspermatozoen (Globozoospermie), die durch das Fehlen des Akrosoms charakterisiert sind, binden und penetrieren die Zona pellucida nicht (SCHILL et al., 1988; VON BERNHARDI et al., 1990). Nur kapazitierte Spermatozoen können die Akrosomreaktion, die einen exozytotischen Prozeß mit Verschmelzung von Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran darstellt, durchführen (SALING et al., 1979; SEIDEL & SMITH, 1986). Die akrosomreagierten Spermatozoen sind dann in der Lage die Zona zu penetrieren (KÖHLER et al., 1982). Dabei wirkt das Zona pellucida Glykoprotein 3 (ZP₃) als physiologischer Induktor der AR (BLEIL & WASSARMAN, 1983, 1986). Es wurde die Hypothese aufgestellt (LEYTON &

SALING, 1989), daß ZP_3 den ZP_3 -Rezeptor, der sich in der Plasmamembran der Spermatozoen befindet, aggregiert. In der Folge führt dies zu dem charakteristischen Calcium-Influx und zur Auslösung der AR. Daneben könnten jedoch noch Fucosehaltige Zonarezeptoren mit unterschiedlicher Bindungsaffinität existieren und an der Bindung und Induktion der AR beteiligt sein (LUCAS et al., 1994).

Nach ZANEVELD et al. (1991) sind bei der Signaltransduktion der Akrosomreaktion und folgenden Induktion mindestens drei verschiedene biochemische Reaktionswege beteiligt. DeJONGE et al. (1991a) postulierte die Aktivierung der Proteinkinase-A nach Bildung von 3'5'-cyclo Adenosinmonophosphat (c-AMP) durch das Enzym Adenylatcyclase. In einem weiteren second-messenger-Weg wird die Proteinkinase-C von Diacylglycerol aktiviert (DeJONGE et al., 1991b). Eine Guanylcyclase, welche Guanylylmonophosphat zu cyclo-Guanylylmonophosphat (c-GMP) umwandelt, soll im dritten Reaktionsweg eine Rolle spielen; c-GMP aktiviert dabei eine c-GMP-abhängige Kinase (ZANEVELD et al., 1991). Diese Hypothese konnte von BIELFELD et al. (1994) bestätigt werden. Zum anderen vermuten STOREY & KOPF (1991) die Beteiligung von G-Proteinen. In allen beschriebenen „second-messenger“-Wegen kommt es zu dem charakteristischen Calcium-Influx und damit zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration.

In vivo wird die Akrosomreaktion neben den Zona pellucida Glykoproteinen auch durch Progesteron induziert (BLACKMORE et al. 1990, BALDI et al., 1991; BLACKMORE & LATTANZIO, 1991; TESARIK et al. 1992a; 1992b; OEHNINGER et al., 1994). Dabei soll Progesteron in vivo mit einem Cortikosteroidbindenden Globulin-ähnlichen Protein (CBG-ähnliches Protein) einen Komplex bilden, der an der Plasmamembran der Spermatozoen enzymatisch gespalten werden soll (MISKA et al., 1994; FEHL et al., 1995). Das dadurch freigesetzte Progesteron bindet an einen in der Plasmamembran vermuteten Progesteronrezeptor (BLACKMORE & LATTANZIO, 1991; BLACKMORE et al., 1991; TESARIK et al., 1992a; 1992b; BALTES, 1996) und induziert die akrosomale Reaktion. Dieser nicht-genomische Progesteronrezeptor soll entweder mit einer membranintegrierten Ca^{2+} -ATPase Pumpe gekoppelt sein, die durch Progesteron gehemmt wird (BLACKMORE et al., 1990), oder über einen Rezeptor-vermittelten Calciumkanal wirken. Das CBG-ähnliche Protein kommt sowohl im Cumulus (BALTES, 1996) als auch in menschlicher Follikularflüssigkeit (MISKA et al., 1994) vor. Von SÁNCHEZ et al.

(1995) konnte demonstriert werden, daß die Synthese und Sekretion im Tubenepithel zyklusabhängig erfolgt. Somit kann die Vermutung geäußert werden, daß ein Teil der Spermatozoen die AR durch den CBG-Komplex bereits am Cumulus induziert und dabei eine Reihe hydrolytischer Enzyme ausgeschüttet wird. Dabei könnte dann die Hyaluronidase den Cumulus oophorus auflockern und andere, akrosomintakte Spermatozoen könnten so leichter bis zur Zona pellucida vordringen und binden. Dort wird durch ZP_3 wiederum die AR induziert und die hydrolytischen Enzyme, v.a. Akrosin, würden unterstützt durch die hyperaktivierte Bewegung der männlichen Gameten die Zonapenetration der Spermatozoen bewirken.

Die in vitro Induktion der AR erfolgt, nach verschiedenen Waschtechniken, durch Supplementierung mit physiologischen Induktoren, wie humaner Follikularflüssigkeit, Progesteron, ZP-Glykoproteinen oder chemischen Stimulantien, zu denen Lysophosphatidylcholine und Ca-Ionophor A23187 gehören (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1993; MORTIMER, 1994; OEHNINGER, 1994; YANAGIMACHI, 1994). Die physikalische Induktion der AR erfolgt durch Inkubation bei Niedrigtemperatur (4°C) (MAHI & YANAGIMACHI, 1973; SÁNCHEZ et al., 1991; HENKEL et al., 1993). In dieser Arbeit scheinen die beiden getesteten Möglichkeiten der Induktion (Niedrigtemperatur und hFF), zumindest im diagnostischen Assay, keine Rolle zu spielen. Dies wird auch durch die sehr hohen Korrelationskoeffizienten ($r=0,9190$ bzw. $r=0,8472$) der maximal induzierten AR bzw. der Induzierbarkeit beim Vergleich zwischen Stimulation mit hFF und Niedrigtemperatur unterstrichen. Dies könnte ein Hinweis auf einen einheitlichen „second-messenger“ Weg beider Induktoren sein (HENKEL et al., 1998b). TESARIK et al. (1993) beobachteten eine unterschiedliche Sensitivität der durch ZP und Progesteron ausgelösten AR gegenüber Pertussistoxin, welches die Signaltransduktion über G-Proteine zu blockieren vermag. Die Wirkung von Progesteron, das als hauptsächlicher Faktor in der Follikularflüssigkeit für die Induktion der AR verantwortlich gemacht wird, scheint nicht G-Protein getriggert zu sein. Dieser Weg der Signalübermittlung könnte somit auch für die Induktion mit Niedrigtemperatur gelten.

LIU & BAKER (1996) konnten im Gegensatz dazu zwischen der chemischen Stimulation mittels Calcium-Ionophor A23187 und der physiologischen mit solubilisierter Zona pellucida keinen Zusammenhang feststellen. Andererseits wurde

aber gezeigt, daß die durch den chemischen Stimulus induzierte AR zur Vorhersage des Fertilisationspotentials herangezogen werden kann (CUMMINS et al., 1991). In der Literatur werden eindeutig physiologische Induktoren wie menschliche Follikularflüssigkeit (CALVO et al., 1989) oder humanes ZP₃ (VAN DUIN, 1994) bevorzugt. Da menschliches Material (ZP₃, hFF) eine natürliche Variabilität aufweist und auch nur in limitierter Menge zur Verfügung steht, kann der Niedrigtemperatur Assay, auch wegen der hohen Korrelation zwischen dem physikalischen Induktor 4°C und dem physiologischen Induktor hFF, im Rahmen eines diagnostischen Tests in der Klinik eingesetzt werden.

Darüber hinaus wird an der Entwicklung von rekombinantem ZP₃ als Stimulus der AR kapazitierter Spermatozoen gearbeitet. So könnten Latexkugeln mit rekombinanten ZP-Glykoproteinen überzogen, als artifizielle ZP, im ZP-Bindungs-Assay und zur Induktion der AR eingesetzt werden.

Lange Zeit gab es keine einfache Technik zur routinemäßigen Bestimmung der AR menschlicher Spermatozoen. Das Akrosom humaner Spermatozoen ist zu klein, um mittels Lichtmikroskop untersucht zu werden. Obwohl die Elektronenmikroskopie die aussagekräftigste und detaillierteste Methode darstellt, ist sie kompliziert und teuer und zur Auswertung vieler Proben in der Routinediagnostik zu zeitaufwendig. Diesbezüglich wurden eine Vielzahl anderer Techniken entwickelt:

- Triple-Stain (TALBOT & CHACON, 1981)
- Monoklonale Antikörper gegen akrosomale Bestandteile (WOLF et al., 1985)
- Chlortetracyclin Fluoreszenz (LEE et al., 1987)
- Fluorescein iso-thiocyanat (FITC)-gekoppelte Lektine, z.B: Pisum sativum agglutinin (CROSS et al., 1986; KÖHN et al., 1996; 1997), Peanut agglutinin (LEE et al., 1987; MORTIMER et al., 1987)

Es konnte eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen dieser Methoden und den ultrastrukturellen Betrachtungen nachgewiesen werden. Für diese Arbeit wurde die Triple-Stain Technik zur Beurteilung des akrosomalen Status herangezogen, da in dieser Methode zwischen normal reagierten lebenden Zellen und toten, degenerativ reagierten Zellen differenziert werden kann. Sie erlaubt deren Unterscheidung in dauerhaft fixierten Ausstrichen auf dem lichtmikroskopischen Weg.

Ein Problem bei der Triple-Stain Technik stellt die Überfärbung mit dem das Akrosom anfärbenden Farbstoff Rosé Bengal dar. Dies kann zu falschen Ergebnissen führen, trat jedoch selten und in der Regel nur bei längerer Anwendung und/oder bei falsch eingestelltem pH-Wert der Färbelösung auf. Je nach Ejakulat zeigten die Spermatozoen ein unterschiedliches Färbeverhalten. Um dies zu kompensieren, wurde erst ein Gesamteindruck über den Ausstrich gewonnen, um die Zellen besser den definierten Stadien zuordnen zu können. Bei der Auswertung der Objektträger wiederholt registrierte Schwankungen der prozentualen AR-Raten hängen im wesentlichen von der Qualität des Ejakulats und der Färbung ab. Darüber hinaus ist der Assay relativ zeitintensiv und ermöglicht nur die Beurteilung einer limitierten Anzahl von Spermatozoen, welche nicht unbedingt die für die Fertilisation entscheidende Fraktion repräsentieren. Die richtige Beurteilung benötigt somit Erfahrung. Die interindividuellen Schwankungen können durch Anwendung der Induzierbarkeit der AR (=Differenz zwischen maximal induzierter AR und spontaner AR), als eigentlichem Parameter der AR, minimiert werden.

Bei fertilen Männern haben >85% der Spermatozoen eines frischen Ejakulats normal ausgebildete Akrosome (WOLF et al., 1985) und die spontane AR liegt bei ca. 10% der Spermatozoen (FENICHEL et al., 1991; DE LAMIRANDE et al., 1993; HENKEL et al., 1993). Einige Autoren (BYRD & WOLF, 1986; STOCK & FRASER, 1987) konstatierten nach 24-stündiger in vitro Inkubation eine spontane AR bei <15%-20% aller Spermatozoen fertiler Spender. BARROS et al. (1984) und SINGER et al. (1985) zeigten, daß Spermatozoen nach übermäßig langer Inkubation nicht mehr an die Zona binden bzw. diese penetrieren können. Die Ursache liegt vermutlich in einer Zunahme der Anzahl akrosomreagerter Spermatozoen, die nicht mehr in der Lage sind an die Zona pellucida zu binden. Hierbei könnte ein Funktionswandel der Spermatozoen stattfinden, wobei die männlichen Gameten erst die Fähigkeit zur Zonabindung und anschließend zur Oolemmabindung aufweisen (HENKEL al., 1996). Dies wird auch von TESARIK et al. (1988b) bestätigt und weisen auf die Notwendigkeit eines exakten Timing der AR hin.

WHITE et al. (1990) zeigten, daß es keinen Zusammenhang zwischen der AR und der Fertilisationsrate normaler humaner Oozyten in vitro gäbe. Bei einer Reihe von weiteren Autoren bestand ebenso keine Korrelation zwischen erfolgreicher IVF und

spontaner bzw. induzierter Reaktion (SMULLEN et al., 1992; PAMPIGLIONE et al., 1993). Im Gegensatz dazu war die Induzierbarkeit der AR (Differenz zwischen maximal induzierter AR und spontaner AR), welche die Fähigkeit vitaler Spermatozoen zur AR beschreibt, bei subfertilen Männern signifikant reduziert oder fehlte vollständig. Dies könnte eine Ursache der männlichen Subfertilität innerhalb der idiopathischen Sterilität darstellen (CUMMINS et al., 1991; FENICHEL et al., 1991; TAKAHASHI et al., 1992; HENKEL et al., 1993; PAMPLIGIONE et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit konnten diese Zusammenhänge durch die Untersuchung der AR nach Kälteinduktion im Rahmen des IVF-Programms gesichert werden. Auch hier fand sich bei reiner Betrachtung des Anteils akrosom-reagierter Spermatozoen nach Induktion mittels Niedrigtemperatur (=Induzierte AR = Maximalwert der AR) kein signifikanter Zusammenhang mit der Fertilisationsrate. Mittels ROC-Kurven Analyse jedoch wurde ein Grenzwert von 13% lebend akrosom-reagierter Spermatozoen berechnet. Höhere Werte haben keinen weiteren Einfluß auf den Eintritt einer erfolgreichen Fertilisation. Sinkt jedoch dieser Anteil unter 13%, so sinkt die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fertilisation drastisch ab. Ein Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen <13% weist folglich auf Sub- bzw. Infertilität des Patienten hin (Spezifität: 98%; Sensitivität: 21,7%; pos. Vorhersagewert: 83,3%; neg. Vorhersagewert: 73,5%). Eine differenziertere Betrachtung ergab, daß die Induzierbarkeit der AR, welche die Fähigkeit der Spermatozoen die Akrosomreaktion zu durchlaufen zum Ausdruck bringt, einen signifikanten Zusammenhang mit der Fertilisationsrate in vitro aufzeigt. Für eine erfolgreiche Fertilisation sollte der Grenzwert von 7,5% überschritten werden. Patienten mit schlechter Fertilisationsrate (<50%) zeigen in der kumulativen Verteilung eine deutliche Linksverschiebung hinsichtlich des Anteils akrosomreagierter Spermatozoen als auch der Induzierbarkeit der AR hin zu geringeren Werten. Eine normale AR und besonders eine normale Induzierbarkeit der AR kann somit als Indikator für eine erfolgreiche Fertilisation herangezogen werden. Dies wird von anderen Autoren ebenso bestätigt (YOVICH et al., 1994; BRANDELLI et al., 1995; CARVER-WARD et al., 1996; KRAUSZ et al., 1996).

5.4. Akrosinaktivität

Das Akrosom enthält eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme, worunter Akrosin das wichtigste mit proteolytischer Aktivität darstellt. Widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung der Bestimmung der Akrosinaktivität und ihres prädiktiven Wertes für eine in vitro Fertilisation im Rahmen der andrologischen Diagnostik wurden aufgezeigt (MOHSENIAN et al., 1982; BURKMAN et al., 1984; KRUGER et al., 1988b; LIU & BAKER, 1990; TUMMON et al., 1991; DeJONGE et al., 1993; SHARMA ET AL., 1993; YANG et al., 1994). Im Laufe der Jahre wurde eine Reihe von Methoden zur Akrosinbestimmung entwickelt, die prinzipiell auf der proteolytischen oder esterolytischen Aktivität dieses Enzyms oder seiner Interaktion mit speziellen Antikörpern basieren (MÜLLER-ESTERL & FRITZ, 1981; PLEBAN et al., 1990). Die in der Praxis hauptsächlich verwendeten Assays oder leicht modifizierte Formen sind:

- Fluorometrischer Assay (HARRISON et al., 1982)
- Spektrophotometrischer Assay mit Benzoyl-Arginin-Ethylester (BAEE) (SCHILL, 1973; SCHILL, 1990)
- Spektrophotometrischer Assay mit N- α -Benzoyl-DL-Arginin-p-nitroanilid, (KENNEDY et al., 1989; TUMMON et al., 1991; DeJONGE et al., 1993)
- Proteolytischer Platten Assay / Gelatinolyse Assay (GADDUM & BLANDAU, 1970; SCHILL, 1974; WENDT et al., 1975; WELKER et al., 1988; HENKEL et al., 1995)

In früheren Ansätzen des proteolytischen Platten Assays wurde die Akrosinaktivität der Spermatozoen mittels gelatinebeschichteter Objektträger (alternativ: Fotoplatten) untersucht. Von WELKER et al. (1988) wurde diese Methode aufgegriffen, modifiziert und in der andrologischen Diagnostik eingesetzt, jedoch ohne Evaluierung des Testsystems. Deshalb wurde in dieser Arbeit diese einfache und kostengünstige Methode modifiziert und verbessert und im IVF-Programm der Gießener Frauenklinik evaluiert.

Der esterolytische Assay (GOODPASTURE et al., 1980) stellt das genaueste dieser Testverfahren dar und beinhaltet die Auflösung des Akrosoms bei niedrigem pH-Wert. Nach weiterer Erniedrigung des pH-Werts konvertiert Proakrosin zu Akrosin

und/oder die Akrosininhibitoren werden vom Akrosin getrennt, so daß die esterolytische Akrosinaktivität durch Hydrolyse von BAEE, einem synthetischen niedermolekularen Substrat, bei optimalem pH gemessen werden kann. Der Vorteil dieser Methode besteht in der getrennten Bestimmung von Proakrosin und Akrosin. Als Nachteil ist der relativ hohe Zeitaufwand anzusehen.

Der amidinolytische Assay ist der am meisten in der andrologischen Diagnostik verwendete Test zur Akrosinbestimmung. Er wurde von KENNEDY 1989 für den Einsatz in der Klinik modifiziert.

Im allgemeinen ist es sehr schwierig die Ergebnisse der einzelnen Testverfahren miteinander zu vergleichen. Die geringste Modifikation in der Testdurchführung kann zu unterschiedlichen Resultaten führen. Somit sind die berechneten Grenzwerte nur jeweils für den entsprechenden Assay bzw. dessen spezielle Modifikation gültig. Wegen der großen Vielzahl der angewendeten Testverfahren in den verschiedenen Kliniken und Praxen, können die ermittelten Werte in den einzelnen Laboratorien nicht miteinander verglichen werden. So läßt sich der mangelnde Konsens in der Literatur größtenteils auf unheitliche Testbedingungen und Beurteilungskriterien in den verschiedenen Labors zurückführen.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Gelatinolysetechnik auch der photometrische Assay mit der Fertilisationsrate in vitro korreliert und darüber hinaus die Ergebnisse miteinander verglichen.

Von den meisten Arbeitsgruppen wurde ein Zusammenhang zwischen der Fertilisationsrate in vitro im IVF-Programm und der Akrosinaktivität der Spermatozoen gefunden (GOODPASTURE et al., 1982; BURKMAN et al., 1984; KENNEDY et al., 1989; SHARMA et al., 1990; TUMMON et al., 1991; DeJONGE et al., 1993). Jedoch sind auch widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur zu finden (KRUGER et al., 1988b; LIU & BAKER, 1990; YANG et al., 1994). Die Ursache für die Diskrepanz könnte bei zwei Arbeitsgruppen in der Verwendung kryokonservierter Proben liegen, was zu erniedrigter bzw. fehlerhafter Akrosinbestimmungen führen kann, da die Kryokonservierung zum Aufreißen des Akrosoms und damit zur Freisetzung von Akrosin führen kann. Bei YANG et al. (1994) fand sich zwar ein Anstieg der Gesamtakrosinaktivität mit gesteigerter Fertilisationsrate, doch die Zunahme war statistisch nicht signifikant. Es zeigten sich großmaschige

Überlappungen hinsichtlich der Akrosinaktivität zwischen fertilisierenden und nicht-fertilisierenden Spermatozoen.

DeJONGE et al. (1993) fanden eine größere Akrosinaktivität in den Ejakulatproben, die >70% reife Eizellen befruchteten, verglichen mit denen, die einen geringen Anteil Eizellen fertilisierten. Diese Autoren zeigten eine gute Korrelation zwischen der Akrosinaktivität vor IVF und dem Erfolg bei der IVF. Diese Ergebnisse wurden von SHARMA et al. (1993) bestätigt, besonders für Spermatozoen nach Aufbereitung mittels Percolldichtegradient. Einzelne Arbeitsgruppen (KENNEDY et al., 1989; BLACKWELL et al., 1992; FRANCAVILLA et al., 1992) konstatierten bestimmte Grenzwerte (entsprechend den jeweilig angewendeten Testverfahren), die überschritten werden mußten, um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fertilisation zu erhöhen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden für die Akrosinaktivität im modifizierten Gelatinolyse Assay die entsprechenden Grenzwerte bzw. Vorhersagewerte evaluiert. Für beide gemessenen Parameter, Halodurchmesser und Haloformationsrate, sowie für den berechneten Akrosinaktivitäts Index zeigte sich eindeutig der prädiktive Wert für die Fertilisation in vitro. In der kumulativen Verteilung der Patienten fiel, entsprechend den Ergebnissen bei der AR und dem HOS-Test, eine deutliche Linksverschiebung zu niedrigeren Werten für die Patienten mit geringer Fertilisation (<50%) auf. Desweiteren fand sich ein Patientenkollektiv, das trotz guter Akrosinaktivität, d.h. die Werte für die Einzelparameter lagen über den entsprechenden Grenzwerten (Halodurchmesser: 10µm; Haloformationsrate: >60%; Akrosinaktivitäts Index: >6), Fertilisationsraten kleiner als 50% zeigte. Wie schon bei den zuvor genannten Spermatozoenfunktionsparametern ist dies auf den relativ geringen Korrelationskoeffizienten ($r \approx 0,4$) der Einzelparameter mit der Fertilisationsrate zurückzuführen. Daraus spiegelt sich erneut die Tatsache wieder, daß es sich beim Fertilisationsprozeß um ein multifaktoriell determiniertes Geschehen handelt, bei dem die Abfolge der verschiedenen funktionellen Parameter beider Gameten erfüllt sein muß. Es zeigt sich folglich eine relativ geringe Sensitivität (Halodurchmesser: 25,7%; Haloformationsrate: 37,1%; Akrosinaktivitäts Index: 25,7%). Im Gegensatz dazu ergab sich eine sehr hohe Spezifität für den Gelatinolyse Assay (Halodurchmesser: 98,7%; Haloformationsrate: 92,0%; Akrosinaktivitäts Index: 97,3%). Das Phänomen der geringen Sensitivität bei hoher Spezifität konnte bereits

bei der Bestimmung der akrosomalen Reaktion, der Spermatozoenkonzentration und -motilität beschrieben werden. Dies legt den Schluß nahe, daß in diesen Fällen die unzureichende Fertilisationsfähigkeit der Spermatozoen auf einen anderen Parameter in der Befruchtungskaskade zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu wurde mittels ROC-Kurven Analyse beim HOS-Test und der Morphologie das umgekehrte Phänomen, d.h. hohe Sensitivität bei geringer Spezifität, ermittelt.

Neben den in dieser Arbeit aufgeführten Parametern können weitere Spermatozofaktoren Ursache eines erniedrigten Fertilisationspotentials sein, wie zum Beispiel: gestörte Chromatinkondensation (AUGER et al., 1990; HOFMANN et al., 1990), geringe Hyperaktivierung (BURKMANN, 1984), unzureichende Zona-Bindung (OEHNINGER et al., 1991; FRANKEN et al., 1993) oder eine gestörte Spermatozoen-Oolemma-Interaktion (KREMER & JAGER, 1990; AITKEN, 1991; HENKEL et al., 1996).

Die hier präsentierten Ergebnisse erhärten somit die These der funktionellen Unabhängigkeit aller Spermatozoenparameter im weitesten Sinne (OEHNINGER et al., 1991; SCHILL et al., 1994; SCHILL, 1995; HENKEL et al., 1993; 1995; 1996; 1997; NIEDERBERGER et al., 1993).

Auch die Messung der Akrosinaktivität mittels Photometer ergab für die Aktivität im Pellet ($P=0,0008$) sowie im Überstand und Pellet zusammen ($P=0,0017$) einen signifikanten Zusammenhang mit der Fertilisationsrate. Der Korrelationskoeffizient ($r=0,414$; $r=0,363$) entsprach ungefähr dem, der für die Gelatinolysetechnik berechnet wurde ($r=0,428$). Die Akrosinaktivität des Überstandes zeigte keinen Zusammenhang mit der Fertilisationsrate. Eine Erklärung hierfür ergibt sich aus der Bedeutungslosigkeit des freien Akrosins im Seminalplasma für den Fertilisationsprozeß, dessen Wirkung in vivo durch natürliche Akrosininhibitoren blockiert wird. Akrosin wird erst beim Kontakt mit der Zona pellucida benötigt. Im Verlauf der AR wird es in ausreichender Menge aus dem Akrosom freigesetzt. Ein Teil des Akrosins bleibt mit seinem lipophilen Ende in der Membran verankert und ist an der sekundären Bindung der Spermatozoen an der Zona pellucida beteiligt. Bei den in dieser Arbeit ermittelten photometrisch bestimmten Akrosinaktivitäten ergaben sich beträchtliche Überschneidungen der Werte zwischen den einzelnen Fertilisationsraten, was sich in den hohen Standardabweichungen widerspiegelt. Dies bestätigt die Ergebnisse aus früheren Publikationen anderer Autoren

(BURKMAN et al., 1984; GERHARD et al., 1987; GOODPASTURE et al., 1987; VAN DER VEN et al., 1987), die starke Überlappungen der Akrosinwerte zwischen den Gruppen fertiler und infertiler Männern fanden. Doch zeigten auch sie signifikante Unterschiede der totalen Akrosinaktivität zwischen diesen beiden Patientenkollektiven. Aufgrund der großen Schwankungen der Werte der Akrosinaktivität und der hohen Standardabweichungen im photometrischen Test wurde in dieser Arbeit auf die Ermittlung von Vorhersagewerten mittels ROC-Kurven Analyse verzichtet.

In den Einzelfällen der Patienten mit Globozoospermie fehlt die Akrosinaktivität, entsprechend des morphologischen Bildes rundköpfiger, akrosomloser Spermatozoen, vollständig und diese Patienten sind infertil (FLÖRKE GERLOFF et al., 1984; SCHILL et al., 1988). Als Tiermodell entsprechen diesen Patienten, die 1994 von BABA et al. generierten „Akrosin-Knock out Mäuse“. Die Zonapenetration dieser Tiere erfolgt verzögert, doch sind die Mäuse fertil (BABA et al., 1994; ADHAM et al., 1997). KOUKOULIS et al. (1989) zeigte, daß ca. 33% der Männer mit ungeklärter Infertilität niedrige Akrosinwerte bei normalem Routinespermiogramm aufweisen. Hiermit liegt der Schluß nahe, daß mittels des Akrosinassays Subpopulationen infertiler oder subfertiler Männer identifiziert werden können, welche mit dem Standardspermiogramm nicht ermittelt werden können.

Bei der Korrelation zwischen der Akrosinaktivität im Gelatinolyse Assay und im Photometrischen Test konnte ein gerade signifikanter Zusammenhang zwischen der Akrosinaktivität des Pellets im photometrischen Assay und dem Halodurchmesser festgestellt werden ($P=0,045$). Dieser war deutlicher bei der Beurteilung der Gesamtakrosinaktivität von Pellet und Überstand zusammen ($P=0,0097$). Der Grund für den relativ niedrigen Korrelationskoeffizienten zwischen beiden Methoden ($r=0,386$ bzw. $r=0,300$) könnte in der unterschiedlichen Messung der Akrosinaktivität liegen.

Ein Schwachpunkt der modifizierten Gelatinolysetechnik ist die manuelle Präparation gleichmäßig dick beschichteter Gelatineobjektträger. Dadurch verursachte Unregelmäßigkeiten können eine unterschiedliche Größe und Verteilung der Halos zur Folge haben. Ebenso können im Seminalplasma vorkommende Akrosininhibitoren zu einer Unterdrückung, bis hin zum Ausbleiben der Halobildung, und damit vermehrt zu falschnegativen Ergebnissen führen. Um eine unkorrekte

Interpretation des Assays zu vermeiden, wurden von den 114 Patienten vier mit falsch negativen Werten in die statistische Berechnung nicht einbezogen. Zur Kompensation dieser Fehlerquellen, wurden weitere Modifikationen der Methode (s. 3.7.1.3.) durchgeführt. Zuerst wurde eine dickere Gelatinebeschichtung verwendet (Alternativmethode 1), zur Entfernung von Akrosininhibitoren im Seminalplasma wurde das Ejakulat einmal gewaschen (Alternativmethode 2) und abschließend wurden beide Modifikationen kombiniert (Alternativmethode 3). Im Vergleich mit dem Ausgangsprotokoll, konnten größere und gleichmäßiger verteilte Halos erzielt werden, was eine subjektiv einfachere und auch zeitsparendere Auswertung zur Folge hat. Mit Alternativmethode 3, d.h. Zentrifugation des Ejakulats zur Eliminierung von Akrosininhibitoren aus dem Seminalplasma sowie dickere Gelatinebeschichtung der Objektträger, konnte eine Zunahme von Halodurchmesser und Akrosinaktivitäts Index um ca. 200% erzielt werden (Klassische Methode/Alternativmethode: 15,6µm/43,6µm; 9,4/34,5). Die Haloformationsrate stieg von 52,2% auf 75,4%. Es zeigte sich bei dieser Modifikation lediglich ein signifikanter Zusammenhang des Akrosinaktivitäts Index mit der Fertilisationsrate (U-Test: $P=0,0054$; $r=0,39$). Eine genauere Evaluierung der Alternativmethode 3 müßte jedoch in einer weiteren, umfangreicheren Versuchsreihe im IVF-Programm der Frauenklinik erfolgen, um die Grenzwerte zur Vorhersage der Fertilisation neu zu definieren.

5.5. In vitro-Fertilisation: „optimaler Spermatozoenfunktionstest“

Die in vitro Fertilisation wurde 1970 erstmalig klinisch relevant. Sie wurde anfänglich nur in der weiblichen Sterilitätsbehandlung eingesetzt. Jetzt ist die IVF auch bei vielen Formen männlicher Fertilitätsprobleme indiziert. In einer Reihe von Fällen führt die klassische IVF jedoch nicht zur erwünschten Schwangerschaft. Die Erfolgsraten derjenigen Paare, bei denen ein andrologischer Sterilitätsfaktor besteht, sind deutlich niedriger, als bei normal fertilen Partnern (THE AMERICAN FERTILITY SOCIETY, 1992). Neben der Bedeutung als effektive Behandlungsmethode, kann die IVF auch als bester diagnostischer Test zur Beurteilung männlicher Fertilität bzw. Infertilität gesehen werden. Die IVF beinhaltet die meisten Schritte, die ein Spermatozoon durchlaufen muß, nachdem es die Ampulle im weiblichen Reproduktionstrakt erreicht hat. Trotzdem stellt selbst die IVF nicht den perfekten Indikator zur Vorhersage einer erfolgreichen Fertilisation in vivo dar. Es wurde gezeigt, daß ein nicht zur

Schwangerschaft führender IVF-Versuch den Erfolg oder Mißerfolg in darauffolgenden Versuchen nicht voraussagen kann (BEN-SHLOMO et al., 1992). Die Fertilisationsrate kann allerdings zur Beurteilung des klinischen Nutzens von Spermatozoenfunktionstests herangezogen werden. Der Fertilisationsprozeß mit all seinen Einzelschritten erfaßt und beinhaltet die einzelnen Spermatozoenparameter und Funktionstests.

In dieser Arbeit konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Spermatozoendichte, -motilität, Membranintegrität, Akrosinaktivität und Induzierbarkeit der AR und der Fertilisationsrate erzielt werden. Diese Spermatozoenfunktionstests geben dem Kliniker die Möglichkeit, den männlichen Sterilitätsfaktor genauer zu charakterisieren. Die Erfassung der Pathophysiologie der Spermatozoen kann den Umgang mit männlicher Infertilität verbessern und deren Therapie erleichtern. Wichtige Voraussetzung hierfür ist das bessere Verständnis der molekularen Grundlagen sowie ihr funktioneller Zusammenhang. Dazu kann die Untersuchung molekularer und funktioneller Mechanismen der Spermatozoenfunktionsparameter sowie deren Beziehung zur Fertilisation in vitro beitragen.

Wie schon bei den einzelnen Testergebnissen erwähnt, kann ein einzelner Assay das Fertilisationspotential nur unzureichend charakterisieren. Die Ursache liegt in der Komplexität der Interaktionen von Spermatozoon und Eizelle. Nach der Ejakulation sind eine Reihe von Faktoren essentiell, damit das Spermatozoon die Eizelle erreichen und anschließend fertilisieren kann. Erst durch den sukzessiven Ablauf funktioneller Parameter kommt es zur Verschmelzung beider Keimzellen (BEIER, 1992). Hierbei können die direkten Wechselwirkungen zwischen männlichen und weiblichen Gameten in zwei Phasen eingeteilt werden. Zum einen in die frühe Interaktion an der Zona pellucida und die späte am Oolemma (GREEN, 1993). Neben dem Spermatozoon muß auch die Eizelle von optimaler Qualität sein. Sowohl der Ooplast (TROUNSON & WEB, 1984), als auch die Zona pellucida muß gereift sein (TESARIK & KOPECNY, 1986; TESARIK et al., 1988b; FAMILIARI et al., 1988). Bei der natürlichen Oozytenreifung erfolgt der Übergang der Metaphase-I zur Metaphase-II Eizelle und dabei wird die Zonareifung durch die Sekretion von Proteoglykanen aus dem Cumulus gefördert. Es muß sowohl die Bindung der

Spermatozoen an die Zona als auch die Fähigkeit zur Induktion der AR gewährleistet sein. Fällt eine der Funktionen aus, kann dies zum Ausbleiben der Fertilisation führen. Eine weitere wichtige Rolle im Fertilisationsprozeß spielt die darauffolgende Bindung der Spermatozoen an das gereifte Oolemma (TROUNSON & WEBB, 1984). Diese wird über Matrixproteine und Adhäsionsmoleküle (VUENTO et al., 1984; GLANDER et al., 1987) vermittelt.

Für dieses multifaktorell determinierte "Ereignis Fertilisationsprozeß" ist somit eine einfache Diagnostik auf der Ebene der klassischen Spermatozoenparameter, wie Zelldichte, Motilität und Morphologie, bei der Untersuchung des andrologischen Sterilitätsfaktors nicht ausreichend. Die Diagnostik sollte mit Hilfe der unterschiedlichen Funktions-Testsysteme als sequentielle Analyse der Einzelschritte in der Befruchtungskaskade erfolgen (OEHNINGER et al., 1991; SCHILL et al., 1994). Wegen der Komplexität der Interaktionen, die auftreten bevor ein ejakuliertes Spermatozoon mit der Eizelle zusammentrifft und diese befruchtet, ist ein einzelner „Fertilitäts-Test“ nicht in der Lage jegliche Fertilitätsstörungen vorherzusagen. Die Frage nach der Idealkombination der zur Verfügung stehenden Spermatozoenfunktionstests ist noch nicht eindeutig geklärt und variiert innerhalb der verschiedenen Institute. Geeignetes Labor-Equipment und strenge Qualitätskontrollen sind zur Etablierung passender und standardisierter Tests notwendig (NEUWINGER et al., 1990; MÜLLER, 1992). Einige dieser aufgeführten Funktionstests sind sehr zeitaufwendig und kompliziert in der Durchführung, wie zum Beispiel der HOP-Test. Für die Zukunft wäre die Entwicklung einfacherer (v.a. biochemischer) Tests wünschenswert. Deren Auswertung sollte kostengünstig, zeitsparend und auch bei einer großen Patientenzahl durchführbar sein. Ein Beispiel hierfür könnte die Einführung eines Assays zur Bestimmung der AR mittels chemischer Induktion sein. Dabei stellt die Niedrigtemperaturinduktion der AR einen ersten Schritt dar. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde (HENKEL et al., 1998b), ist die Kälteinduktion mit der physiologischen Induktion der AR durch hFF vergleichbar. Dies trifft für die Induktion mittels Ca-Ionophor nicht zu (LIU & BAKER, 1996). Die Bindungsfähigkeit kapazitierter Spermatozoen an die Zona könnte mittels Bindung an rekombinantes ZP_3 , wenn dieses in biologisch aktiver Form und in ausreichender Menge zu produzieren ist, mit einer leicht quantifizierbaren, chromogenen Methode gemessen werden. Vorteil hierbei wäre die Objektivierung

der Beurteilung der Spermatozoen. Darüber hinaus wäre die Auswertung mehrerer tausend und nicht nur einiger hundert Spermatozoen möglich.

Dies ist jedoch in der Praxis bisher noch nicht etabliert und evaluiert. Erste Ansätze hierfür wurden für die Bestimmung der Akrosomreaktion mittels Durchflußzytometrie unternommen (PURVIS et al., 1990, CARVER-WARD et al., 1996). Bis dahin sollten bestimmte zur Verfügung stehende Spermatozoonfunktionstests ausgewählt und v.a. bei Patienten mit idiopathischer Sterilität eingesetzt werden. Anhand dieser Ergebnisse sollte entschieden werden, welches Reproduktionsverfahren angewendet werden soll.

Die Spermatozoonfunktionsparameter sollen eine rationale Methode zum Identifizieren und Umgehen von Spermatozoendefekten darstellen. Das Ziel ist die Selektion der geeigneten, individuellen Therapie. Diese individualisierte Auswahl der Behandlungsform könnte die Erfolgsrate vieler Sterilitätspatienten mit männlichem Faktor verbessern. Doch sollte immer im Auge behalten werden, daß es nicht sinnvoll ist, die gesamte Palette an Funktionstests an einem Patienten zu testen. Dies sollte individuell und mit System erfolgen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Befruchtungsvorgang stellt ein komplexes, multifaktoriell determiniertes Ereignis dar, in dem sowohl das Spermatozoon als auch die Oozyte „optimale“ Qualität aufweisen müsse. Das Spermatozoon hat die Aufgabe die männliche Erbinformation zur Eizelle zu transportieren mit dem Ziel der Fertilisation. In der „Befruchtungskaskade“ wird die Verschmelzung von männlicher und weiblicher Keimzelle, nur durch einen geregelten Ablauf der einzelnen funktionellen Parameter erreicht.

Offensichtlich sind diese Zusammenhänge bei den „klassischen Spermatozoenparametern“ Zelldichte, Motilität und Morphologie. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Spermatozoenkonzentration, Motilität, einschließlich Progressivmotilität, und der Fertilisationsrate in vitro. Diese Resultate unterstreichen, daß männliche Keimzellen über Eigenbeweglichkeit verfügen müssen, um am Ort der Befruchtung die Eihülle zu penetrieren. Desweiteren müssen sie für ihre Aufgaben morphologisch optimal angepaßt sein.

Für eine erfolgreiche Fertilisation sind darüber hinaus eine Reihe komplexer Spermatozoenfunktionen und Interaktionen mit der Eizelle vorauszusetzen, die individuell mit verschiedenen Spermatozoenfunktionstests überprüft werden können. Die Vitalität eines Spermatozoons, und damit die funktionelle Integrität seiner Plasmamembran, kann mittels hypoosmotischem Schwelltest (HOS-Test) anhand typischer Schwellungsphänome der Flagellen beurteilt werden. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte die Gesamtzahl (B-G-Typ) geschwollener Spermatozoen einen deutlich prädiktiven Wert für die Fertilisationsrate im IVF-Programm ($P=0,006$; $r=0,419$). Auch der Anteil an G-Typ Spermatozoen wies einen, jedoch nicht so deutlichen, Zusammenhang mit der Fertilisationsrate auf ($P=0,0198$; $r=0,404$). Mittels ROC-Kurven Analyse wurde für die Gesamtzahl geschwollener Spermatozoen der Grenzwert zu 63% und für die G-Typ Spermatozoen zu 19% errechnet. Hierbei konnte bei Differenzierung zwischen „fertilen“ und „infertilen“ Patienten eine maximale Spezifität und ein maximaler positiver Vorhersagewert (100%) für B-G-Typ Spermatozoen berechnet werden. Der Korrelationskoeffizient zwischen den beiden Parametern (B-G-Typ und G-Typ-Spermatozoen) war mit $r=0,67$ zu niedrig, um lediglich die G-Typ Spermatozoen als Fertilitätsindex heranzuziehen.

Neben den klassischen Spermatozoenparametern und der Membranintegrität spielt auch die Akrosomreaktion (AR) bei der Interaktion zwischen männlicher und weiblicher Keimzelle eine entscheidende Rolle. Es wurde daher in dieser Arbeit die AR im IVF-Programm der Frauenklinik Gießen evaluiert. Als Testsystem zur Differenzierung zwischen lebend reagierten und lebend nicht reagierten Spermatozoen wurde die Triple-Stain Technik nach Niedrigtemperaturinduktion angewendet. Sowohl die Induzierte AR (= Anteil lebend akrosom-reagierter Spermatozoen) als auch die Induzierbarkeit der AR (= Differenz zwischen maximal Induzierter AR und spontaner AR) wurden mit der Fertilisationsrate in vitro korreliert. Es zeigte sich, daß der Anteil akrosom-reagierter Spermatozoen nach Induktion >13% sein sollte, da bei einem geringerem Anteil reagierter Spermatozoen die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Fertilisation deutlich abnimmt. Jedoch unterschieden sich die Patienten mit guter Fertilisationsrate (>50%) nicht von denen mit schlechter Fertilisationsrate (<50%). Der mittels ROC-Kurven Analyse ermittelte Grenzwert von 7,5% für die Induzierbarkeit der AR hat deutlichen prädiktiven Wert. Der Assay wies eine relativ geringe Sensitivität (50%) bei hoher Spezifität (86%) auf. Dies weist auf die Tatsache hin, daß es sich beim Fertilisationsprozeß um ein multifaktorielles Geschehen handelt und eine schlechte Fertilisationsfähigkeit in diesem Fall auf einen anderen, wichtigen Parameter innerhalb der Befruchtungskaskade zurückzuführen ist.

Beim Vergleich zwischen nicht-physiologischer Induktion der AR (Niedrigtemperatur) mit der physiologischen mittels menschlicher Follikularflüssigkeit, zeigte sich sowohl für die Induzierte AR als auch für die Induzierbarkeit eine stark positive Korrelation zwischen beiden Stimulatoren ($r=0,919$; $P<0,0001$ bzw. $r=0,8472$; $P<0,0001$). Somit kann die nicht-physiologische Induktion im diagnostischen Assay zur Bestimmung der AR eingesetzt werden.

Das vermutlich wichtigste Enzym, welches während der AR freigesetzt wird, ist das Penetrationsenzym Akrosin. In dieser Arbeit wurde die Akrosinaktivität mit Hilfe der Gelatinolysetechnik und mit einem photometrischen Testsystem bestimmt und beide Methoden miteinander verglichen. Beim Gelatinolyse Assay zeigten sich zwischen Halodurchmesser, Haloformationsrate und Akrosinaktivitäts Index signifikante Zusammenhänge zur Fertilisationsrate. Die entsprechenden Grenzwerte wurden zu

10 µm, 60% und 6 berechnet. Ähnlich der AR wies der Assay eine hohe Spezifität bei niedriger Sensitivität auf.

Mit Zentrifugation des Ejakulats und einer dickeren Gelatinebeschichtung der Objektträger konnte die subjektive Auswertung durch gleichmäßigere Verteilung und zunehmende Größe der Halos erleichtert werden. Auch falsch-negative Ergebnisse konnten verringert werden.

Neben der Gelatinolysetechnik wurde die esterolytische Aktivität des Akrosins mit einem photometrischen Testverfahren gemessen. Entsprechend ergab sich sowohl für die Akrosinaktivität im Pellet als auch im Überstand + Pellet ein signifikanter Zusammenhang mit der Fertilisationsrate ($P=0,0085$; $r=0,4143$ bzw. $P=0,05$; $r=0,363$).

Beim Vergleich beider Methoden zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang v.a. zwischen Halodurchmesser und Gesamtakrosinaktivität im Pellet und Überstand bei relativ niedrigem Korrelationskoeffizienten ($P=0,0097$; $r=0,386$).

Insgesamt wurden zwischen den Spermatozoenparametern und der Fertilisationsrate bzw. zwischen den einzelnen Parametern untereinander relativ niedrige Korrelationskoeffizienten errechnet. Dies bestätigt die Annahme, daß der Fertilisationsvorgang einen komplexen, durch viele Faktoren bestimmten Vorgang darstellt, wobei die einzelnen Parameter und Funktionen untereinander weitestgehend unabhängig sind. Eine erfolgreiche Fertilisation setzt die sukzessive Abfolge dieser Einzelfaktoren voraus.

Diese Arbeit zeigt, daß neben den „klassischen Ejakulatparametern“ die Anwendung gezielter Spermatozoenfunktionstests sinnvoll ist. Sie dienen dazu Ursachen, welche für die männliche Infertilität verantwortlich sein könnten, zu diagnostizieren, die Pathophysiologie zu verstehen und gegebenenfalls auch zu therapieren. Darüber hinaus können sie zur Vorhersage der Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Fertilisation in vivo oder in vitro beitragen und die Frage nach geeigneten Techniken der assistierten Reproduktion klären helfen. Somit kann die Inzidenz der „idiopathischen Sterilität“ vermindert werden. Da kein Spermatozoen Assay den globalen Indikator für männliche Fertilität bzw. Infertilität darstellt, müssen die Testsysteme individuell ausgewählt werden, um das Fertilisationspotential der Gameten möglichst objektiv einschätzen zu können.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Acosta, A.A., Kruger, T.F. (1996). Human Spermatozoa in assisted Reproduction. 2nd ed., The Parthenon Publishing Group, New York, London.

Adham, I.M., Nayernia, K., Engel, W. (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 46, 370-376.

Aitken, R.J. (1989). Motility parameter and fertility. In: Controls of sperm motility: biological and clinical aspects, Gagnon C. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Aitken, R.J. (1991). Reproductive biology. Do sperm find eggs attractive? *Nature* 351, 19-20.

Aitken, R.J., Clarkson, J.S. (1988). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.* 9, 367-376.

Aitken, R.J., Irvine, D.S., Wu, F.C. (1991). Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 164, 542-551.

Aitken, R.J., Ross, A., Lees, M.M. (1983). Analysis of sperm function in Kartagener's syndrom. *Fertil. Steril.* 40, 696-698.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1990). Molekularbiologie der Zelle. 2. Auflage, VCH-Verlag, Weinheim, Basel, Cambridge, New York.

Amelar, R.D., Dubin, L., Schoenfeld, C. (1973). Semen analysis: An office technique. *Urology* 2, 605-611.

Andolz, P., Bielsa, M.A., Genesca, A., Benet, J., Egozcue, J. (1987). Improvement of sperm quality in abnormal semen samples using a modified swim-up procedure. *Hum. Reprod.* 2, 99-101.

Auger, J., Mesbah, M., Huber, C., Dadoune, J.P. (1990). Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics between proven fertile and suspected infertile men. *Int. J. Androl.* 13, 452-462.

Austin, C.R. (1951). Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. (B)* 4, 4-581.

Austin, C.R. (1960). Capacitation and release of hyaluronidase from spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1, 310-311.

Austin, C.R. (1975). Membrane fusion events in fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 44, 155-166.

Austin, C.R. (1985). Sperm maturation in the male and female genital tracts. In: Metz C.B., Monroy, A. (eds.), *Biology of Fertilization*. Fla: Academic Press Inc., 2, Orlando, pp. 121-155.

Austin, C.R., Bishop, M.W.H. (1958). Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 149, 241-248.

Avery, S., Bolton, V.M., Mason, B.A. (1990). An evaluation of the hypo-osmotic swelling test as a predictor of fertilizing capacity in vitro. *Int. J. Androl.* 13, 93-99.

Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S., Toyody, Y. (1994). Sperma from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J. Biol. Chem.* 169, 31845-31849.

Baccetti, B., Bigliardi, E., Burrini, A.G. (1973). The accessory fibers of the sperm tail. Structure and chemical composition of the bull coarse fibers. *J. Submicrosc. Cytol.* 5, 237-256.

Baer von, C.E. (1827). De ovi mammalium et hominis genesis. Epistolam ad Academiam Imperialem Scientarum Petropolitanam; Lipsiae Sumptibus Leopoldi Vossii (Leopold Voss), Leipzig.

Baker, H.W.G., Burger, H.G., de Kretser, D.M., Hudson, B., Rennie, G.C., Straffon, W.G.E. (1985). Testicular vein ligation and fertility in men with varicoceles. *Br. Med. J.* 291, 1678-1680.

Baker, H.W.G., Clarke, G.N. (1987). Sperm morphology: consistency of assessment of the same sperm by different observers. *Clin. Reprod. Fertil.* 5, 37-43.

Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, C., Maggi, M., Forti, G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl.* 12, 323-330.

Baltes, P. (1996). Molekulare Grundlagen der Induktion der Akrosomreaktion durch menschliche Follikularflüssigkeit. Inaugural-Dissertation am Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Baltz, J.M., Oneeka Williams, P., Cone, R.A. (1990). Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol. Reprod.* 43, 585-491.

Barfield, A., Melo, J., Coutinho, E., Alvarez-Sanchez, F., Faundes, A., Brache, V. (1979). Pregnancies associated with sperm concentration below 10 million/ml in clinical studies of potential male contraceptive method, monthly depot medroxyprogesteron acetate and testosterone esters. *Contraception* 20, 121-127.-

Barrat, C.L.R., Osborn, J.C., Harrison, P.E., Monks, N., Dunphy, B.C., Cooke, I.D. (1989). The hypo-osmotic swelling test and the sperm mucus penetration test in determining fertilization of human oocytes. *Human. Reprod.* 4, 430-434.

Barros, C., Bedford, J.M., Franklin, L.E., Austin, C.R. (1967). Membrane vesiculation as a feature of mammalian acrosome reaction. *J. Cell. Biol.* 34, C1-C5.

Barros, C., Bedford, J.M., Franklin, L.E., Austin, C.R. (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J. Cell. Biol.* 34, C1-C5.

Barros, C., Jedlicki, A., Bize, I., Aguire, E. (1984). Relationship between the length of sperm preincubation and zona penetration in the golden hamster: A scanning electron microscopy study. *Gamete. Res.* 9, 31-43.

Barry, M. (1840). Researches in embryology: Third series; A contribution to the physiology of cells. Phil Trans Roy Soc London, part 2, pp. 529-593.

Bautzmann, H. (1943). Johannes Müller und unsere Lehre von der organischen Gliederung und Entwicklung. *Anat. Anz.* 94, 225-256.

Bedford, J.M. (1983). Form and function of eutherian spermatozoa in the relation of the nature of egg vestments. In: Fertilization of the human egg in vitro. Beier, H.M., Lindner, H.R. (eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, pp. 133-146.

Bedford, J.M., Kim, H.H. (1991). Sperm-egg binding patterns and oocyte cytology in retrospective analysis of fertilization failure in vitro. *Hum. Reprod.* 8, 453-463.

Beier, H.M. (1992). Die molekulare Biologie der Befruchtungskaskade und der beginnenden Embryonalentwicklung. *Ann. Anat.* 174, 491-508.

Bellve, A.R., O'Brien, D. (1983). The mammalian spermatozoon. Structure and temporal assembly. In: Mechanism and Control of Animal Fertilization. Hartmann JF (ed.), New York Academic, pp. 55-137.

Belsey, M.A., Eliasson, R., Gallegos, A.J., Moghissi, K.S., Paulson, C.A., Prasad, M.R.N., editors (1980). World Health Organization laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Press Concern, Singapore.

Ben-Shlomo, I., Bider, I., Dor, J., Levran, D., Mashiach, S., Ben-Rafael, Z. (1992). Failure to fertilize in vitro in couples with male factor infertility: what next? *Fertil. Steril.* 58, 187.

Benoff, S., Cooper, G.S., Hurley, I., Napolitano, B., Rosenfeld, F.L., School, G.M., Hershlag, A. (1993). Human sperm fertilizing potential in vitro is correlated with different expression of a head-specific mannose-ligand receptor. *Fertil. Steril.* 59, 854-862.

Berthold, A. (1849). Transplantation der Hoden. *Arch. Anat. Physiol. Wissen. Med.*, 42-46. The transplantation of testis. Translation by Quiring, D.P. (1944). *Bull.Hist. Med.* 16, 399-401.

Bielfeld, P., Faridi, A., Zaneveld, L.J.D., DeJonge, C.J. (1994). The zona-pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa is mediated by protein kinases. *Fertil. Steril.* 61, 536-541.

Biggers, J.D., Whitten, W.K., Whittingham, D.-G. (1971). The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel, J.C. (ed.) *Methods in Mammalian Embryology*, Freeman, San Francisco, pp. 88-116.

Birkhead, T.R. (1995). Sperm competition: evolutionary causes and consequences. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 755-775.

Blackmore, P.F., Beebe, S.I., Danforth, D.R., Alexander, N. (1990). Progesteron and 17 α -Hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J. Biol. Chem.* 265, 1376-1380.

Blackmore, P.F., Lattanzio, F.A. (1991). Cell surface localization of a novel non-genomic progesterone receptor on the head of human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 331-336.

Blackwell, J., Kaminski, J.M., Bielfeld, P., Mack, S.R., Zaneveld, L.J.D. (1992). Human sperm acrosin. Further studies with the clinical assay and activity in a group of presumably fertile men. *J. Androl.* 13, 571-578.

Bleil, J.D., Wassarman, P.M. (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* 95, 317-324.

Bleil, J.D., Wassarman, P.M. (1986). Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J. Cell. Biol.* 102, 1363-1371.

Bostofte, E., Serup, J., Rebbe, H. (1982). Relation between sperm count and semen volume, and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period. *Int. J. Androl.* 5, 267-275.

Bostofte, E., Serup, J., Rebbe, H. (1985). The clinical value of morphological rating of human spermatozoa. *Int. J. Fertil.* 30, 31-37.

Brandelli, A., Miranda, P.V., Anon-Vazquez, M.G., Marin-Brigiler, C.I., Sanjurjo, C., Gonzalez-Echeverria, F., Blaquier, J.A., Tezon, J.G. (1995). A new predictive test for in-vitro fertilization based on the induction of sperm acrosome reaction by N-acetylglucosamine-neoglycoprotein. *Hum. Reprod.* 10 (7), 1751-1756.

Brenner, W. (1981). Historical aspects of the study of the testis. In: Burger, H., Kretser, D. (eds). *The testis*. Raven, New York, pp.1-5.

Brown, C.R., Harrison, R.A. (1978). The activation of proacrosin in spermatozoa from ram bull and boar. *Biochem. Biophys. Acta* 526, 202-217.

Brucker, C., Lipford, G.B. (1995). The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum. Reprod. Update.* 1, 51-62.

Bruckert, E. (1991). How frequent is unintentional childlessness in Germany? *Andrologia* 23, 245-250.

Buch, J.P. (1993). Advance sperm function testing. *Curr. Opin. Urol.* 3, 503.

Burger, H.G., Baker, H.W.G. (1984). Therapeutic considerations and results of gonadotrophin treatment in male hypogonadotrophic hypogonadism. *Ann. NY Acad. Sci.* 438, 447-452.

Burkman, L.J. (1990). Hyperactivated motility of human spermatozoa during in vitro capacitation and implications for fertility. In: Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects (Gagnon C. ed.), CrC Press Boca Raton; pp. 303-329.

Burkman, L.J., Coddington, C.C., Franken, D.R., Kruger, T.F., Rosenwaks, Z., Hodgen, G.D. (1988). The hemizona assay (HZA): Development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil. Steril.* 49, 688-669.

Burkman, L.J., Syner, F.N., Moghissi, K.S., Acosta, A. (1984). Sperm acrosin content and semen parameters for successful in vitro fertilization: 'normal' and oligospermic groups. *Fertil. Steril.* 41, 102.

Byrd, W., Wolf, D.P. (1986). Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. *Biol. Reprod.* 5, 84-88.

Calvo, L., Vantman, D., Banks, S.M., Tezon, J., Koukoulis, G.N., Dennison, L., Sherins, R.J. (1989). Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. *Fertil. Steril.* 52, 1048-1054.

Carver-Ward, J.A., Jaroudi, K.A., Hollanders, J.M., Einspinner, M. (1996). High fertilization prediction by flow cytometric analysis of the CD46 antigen on the inner acrosomal membrane of spermatozoa. *Hum. Reprod.* 11 (9), 1923-1928.

Cary, W.H. (1916). Examination of semen with reference to gynecological aspects. *Am. J. Obstet. Dis. Women Child.* 74, 615-638.

Cary, W.H., Hotchkiss, R.S. (1934). Semen appraisal. A differential stain that advances the study of cell morphology. *J. Am. Med. Assoc.* 102, 587-590.

Centolai, G.M., Mattox, J.A. (1988). Preparation of frozen-thawed semen for intrauterine insemination. *Proceeding of the Annual Meeting of the American Fertility Society*, pp. 18-57.

Chan, S.Y.W., Fox, E.J., Chan, M.M.C., Tsoi, W., Wang, C., Tang, L.C.M., Tang, G.W.K., Ho, P. (1985). The relationship between the human sperm hypo-osmotic swelling test, routine semen analysis and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. *Fertil. Steril.* 44, 668-672.

Chan, S.Y.W., Wang, C. (1987). Correlation between semen adenosine triphosphate and sperm fertilizing capacity. *Fertil. Steril.* 47, 717-719.

Chan, S.Y.W., Wang, C., Chan, S.T.H., Ho, P. (1990). Differential evaluation of human sperm hypo-osmotic swelling test and its relationship with the outcome of in vitro fertilization of human oocytes. *Human. Reprod.* 5, 84-88.

Chan, S.Y.W., Wang, C., Ng, N., So, W.W.K., Ho, P. (1988). Multivariate discriminant analysis of the relationship between the hypo-osmotic swelling test and the in vitro fertilization capacity of human sperm. *Int. J. Androl.* 11, 369-378.

Chang, M.C. (1957). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the Fallopian tubes. *Nature* 168, 459-461.

Chang, M.C. (1984). The meaning of sperm capacitation. *J. Androl.* 5, 45-50.

Check, J.H., Epstein, R., Noworoozi, K., Shanis, B.S., Wu, C.H., Bollendorf, A. (1989). The hypoosmotic swelling test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential. *Fertil. Steril.* 52, 159.

Check, J.H., Adelson, H.G., Schubert, B.R., Bollendorf, A. (1992). Evaluation of sperm morphology using Kruger's strict criteria. *Arch. Androl.* 28, 15.

Check, J.H., Baker, A., Benfer, K., Lurie, D., Katsoff, D. (1996). Transfer of cryopreserved embryos improved pregnancy rates in patients with damage to the

functional integrity of the sperm membrane as measured by the hypo-osmotic swelling test. *Fertil. Steril.* 65, 1241-1244.

Check, J.H., Stumpo, L., Lurie, D., Benfer, K., Callan, C (1995). A comparative prospective study using the matched samples to determine the influence of subnormal hypo-osmotic test scores of spermatozoa on subsequent fertilization and pregnancy rates following in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 10, 1197-1200.

Coetzee, K., Kruger, T.F., Menkveld, R., Lombard, C.J., Swanson, J.R. (1989). Hypo-osmotic swelling test in the prediction of male fertility. *Arch. Androl.* 23, 131-138.

Cohen, J., Weber, R.F.A., van der Vijver, J.C.M., Zeimaker, G.H. (1982). In vitro fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona-free hamster ova: Interassay variation and prognostic value. *Fertil. Steril.* 37, 565-572.

Comhaire, F., Schoonjans, F., Vermeulen, L., De Clercq, N. (1994). Methodological aspects of sperm morphology evaluation: comparison between strict and liberal criteria. *Fertil. Steril.* 62, 857.

Cooper, T.G. (1986). *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilisation*. Springer Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.

Cooper, T.G., Baker, H.W. (1986). Protein carboxyl methylase in asthenospermia. *Clin. Reprod. Fertil.* 4, 269-274.

Corselli, J., Talbot, P. (1987). In vitro penetration of hamster oocyte-cumulus complexes using physiological numbers of sperm. *Dev. Biol.* 122, 227-242.

Cotterell, A. (1989). *The illustrated encyclopaedia of Myths and Legends*. Castle Publishers Ltd., London, p. 205.

Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., Hanson, F.W. (1986). Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* 15, 213-226.

Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., Hanson, F.W. (1988). Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Bio. Reprod.* 38, 235-244.

Croxatto, H.B., Oritz, M.E., Diaz, S., Hess, R., Balmaceda, J. Croxatto, H.D. (1978). Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following the luteinizing hormone peak. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 132, 629-634.

Cummins, J.M., Pember, S.M., Jequier, A.M., Yovich, J.L., Hartmann, P.E. (1991). A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other semen parameters. *J. Androl.* 12, 98-103.

Cummins, J.M., Woodall, P.F. (1985). On mammalian sperm dimensions. *J. Reprod. Fert.* 75, 153-175.

Cummins, J.M., Yanagimachi, R. (1982). Sperm-egg ratios and the site of the acrosome reaction during in vivo fertilization in the hamster. *Gamete. Res.* 5, 239-256.

Dadoune, J.P. (1988). Ultrastructural abnormalities of human sperm. *Human. Reprod.* 3, 311-318.

David, G., Jouannet, P., Martin-Boyce, A., Schwartz, D. (1979). Sperm counts in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 31, 453-455.

De Castro, M., Jeyendran, R.S., Zaneveld, L.J. (1990). Hypo-osmotic swelling test: analysis of prevasectomy ejaculates. *Arch. Andro.* 24, 11-16.

De Graf, R. (1668). *De Virorum Organis Generationi Inservientibus, De Clysteribus Et De Usu Siphonis In Anatomis*. Lugd. Batan et Roterod. ex off. Hackiana.

DeJonge, C.J., Han, H.L., Lawrie, H., Mack, S., Zaneveld, L.J.D. (1991a). Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J. Exp. Zool.* 258, 113-125.

DeJonge, C.J., Han, H.L., Mack, S., Zaneveld, L.J.D. (1991b). Effect of phorbol diesters, synthetic diacylglycerols, and protein kinase C inhibitor on the human sperm acrosome reaction. *J. Androl.* 12, 62-70.

DeJonge, C.J., Mack, S.R., Zaneveld, L.J.D. (1989). Inhibition of the human sperm acrosome reaction by proteinase inhibitors. *Gamete Res.* 23, 387-397.

DeJonge, C.J., Tarchala, S.M., Rawlins, R.G., Binor, Z., Radwanska, E. (1993). Acrosin activity in human spermatozoa in relation to semen quality and in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 8, 253-257.

De Lamirande, E., Eiley, D., Gagnon, C. (1993). Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int. J. Androl.* 16, 258.

De Lamirande, E., Gagnon, C. (1993). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int. J. Androl.* 16, 21.

Delgado, N.M., Reyes, R., Mora-Galindo, J., Rosado, A. (1988). Size-uniform heparin fragments as nuclear decondensation and acrosome reaction inducers in human spermatozoa. *Life Sci.* 42, 2177-2183.

Drobnis, E.Z., Yudin, A.I., Cherr, G.N., Katz, D.F. (1988a). Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Dev. Biol.* 130, 331-323.

Drobnis, E.Z., Yudin, A.I., Cherr, G.N., Katz, D.F. (1988b). Kinematics of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete Res.* 21, 367-383.

Duncan, W.M., Glew, M.J., Wang, X.J., Flaherty, S.P., Matthews, C.D. (1993). Prediction of in vitro fertilization rates from semen variables. *Fertil. Steril.* 59, 1233.

Edwards, R.G., Steptoe, P.C. (1980). *A Matter of Life*. Hutchinson, London.

Eliasson, R. (1971). Standards for investigation of human semen. *Andrologia* 3, 49-64.

Eliasson, R. (1975). Analysis of semen. In: Behrman, S.J., Kistner, S.W. (eds), *Progress in infertility*, 2nd edn., Little Brown Co, Boston, pp. 691-713.

Enginsu, M.E., Domoulin, C.J.M., Pieters, M.H.E.C., Bras, M., Evers, J.L.H., Geraedts, J.P.M. (1991). Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quick staining: correlation of morphology with fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 6, 854-858.

Famulari, G., Nottola, S.A., Micara, G., Arafona, C., Motta, P.M. (1988). Is the spermabinding capacity of the zona pellucida linked to its surface structure? A scanning electron microscopic study of human in vitro fertilization. *J. in vitro Fertil. And Embryo Transfer* 5, 134-143.

Fawcett, D.W. (1975). The Mammalian Spermatozoon. *Dev. Biol.* 44, 394-436.

Fehl, P., Miska, W., Henkel, R. (1995). Further indications of the multicomponent nature of the acrosome reaction-inducing substance of human follicular fluid. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 80-88.

Fenichel, P., Donzeau, M., Farahifar, D., Basteris, B., Ayraud, N., Hsi, B.L. (1991). Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 55, 994.

Flörke-Gerloff, S., Töpfer-Petersen, E., Müller-Esterl, W., Mansouri, A., Schatz, R., Schirren, C., Schill, W.-B., Engel, W. (1984). Biochemical and genetic investigation of round-headed spermatozoa in infertile men including two brothers and their father. *Andrologia* 16, 187-202..

Fock-Nüzel, R., Lottspeich, F., Henschen, A., Müller-Esterl, W. (1984). Boar acrosin is a two-chain molecule. Isolation and primary structure of the light chain; homology with the pro-part of other serine proteinases. *Eur. J. Biochem.* 141, 441-446.

Foresta, C., Mioni, R., Rossato, M., Varotto, A., Zorzi, M. (1991). Evidence for the involvement of sperm angiotensin converting enzyme in fertilization. *Int. J. Androl.* 14, 333-339.

Francavilla, S., Palermo, G., Gabriele, A., Cordeschi, G., Poccia, G. (1992). Sperm acrosin activity and fluorescence microscopic assessment of proacrosin/acrosin in ejaculates of infertile and fertile men. *Fertil. Steril.* 57, 1311-1315.

Franken, D.R., Acosta, A.A., Kruger, T.F., Lombard, C.J., Oehninger, S., Hodgen, G.H. (1993). The hemizona assay: Its role in identifying male factor infertility in assisted reproduction. *Fertil. Steril.* 59, 1075-1080.

Franken, D.R., Coddington, C.C., Burkman, L.J., Oosthuizen, W.T., Oehninger, S.C., Kruger, T.F., Hodgen, G.D. (1991a). Defining the valid hemizona assay: accounting for binding variability within zonae pellucidae and within semen samples from fertile males. *Fertil. Steril.* 56, 1156-1160.

Franken, D.R., Oosthuizen, W.T., Cooper, S., Kruger, T.F., Burkman, L.J., Coddington, C.C., Hodgen, G.D. (1991b). Electron microscopic evidence on the acrosomal status of bound sperm and their penetration into human hemizonae pellucidae after storage in a buffered salt solution. *Andrologia* 23, 205-208.

Fraser, L.R. (1998). Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 13 (Suppl. 1), 9-19.

Freund, M. (1966). Standards for the rating of human sperm morphology. A cooperative study. *Int. J. Fertil.* 11, 97-118.

Gaddum, P., Blandau, R.J. (1970). Proteolytic reaction of mammalian spermatozoa on fixed gelatin membranes. *Science* 170, 749-751.

Gerhard, I., Fröhlich, E., Eggert-Kruse, W., Klinga, K., Runnebaum, B., Hofmann, H., Petzold, D. (1987). Relationship of sperm acrosin to clinical and semen parameters in infertile patients. *Hum. Reprod.* 2 (Suppl. 1), 11.

Gibbons, I.R. (1981). Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell. Biol.* 91, 107-124.

Glander, H.J., Herrmann, K., Haustein, U.F. (1987). The equatorial fibronectin band (EBF) on human spermatozoa - a diagnostic help for male infertility? *Andrologia* 19, 456-459.

Goodpasture, J.C., Polakoski, K.L., Zaneveld, L.J.D. (1980). Acrosin, proacrosin, and acrosin inhibitor of human spermatozoa: extraction, quantitation, and stability. *J. Androl.* 1, 16-27.

Goodpasture, J.C., Zavos, P.M., Cohen, M.R., Zaneveld, L.J.D. (1982). Relationship of human sperm acrosin and proacrosin to semen parameters. I. Comparison between symptomatic men of infertile couples and asymptomatic men, and between different split ejaculate fractions. *J. Androl.* 3, 151-156.

Goodpasture, J.C., Zavos, P.M., Zaneveld, L.J.D. (1987). Relationship of human sperm acrosin and proacrosin to semen parameters. II. Correlations. *J. Androl.* 8, 267-271.

Green, D.P. (1978). The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J. Cell Sci.* 32, 137-151.

Green, D.P. (1993). Mammalian fertilization as a biological machine: a working model for adhesion and fusion of sperm and oocyte. *Hum. Reprod.* 8, 91-96.

Grow, D.R., Oehninger, S., Seltman H.J., Toner, J.P., Swanson, R.J., Kruger, T.F., Muasher, S.J. (1994). Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vivo fertilization population. *Fertil. Steril.* 62, 559.

Habenicht, U.-F. (1987). Akrosin - ein bedeutendes Enzym für die Fertilisation. *Fertilität* 3, 7-11.

Hagman, J.R., Moyer, J.S., Bachmann, E.S., Sibony, M., Magyar, P.L., Welch, J.E., Smithies, O., Krege, J.H., O'Brien, D.A. (1998). Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 2552-2557.

Hammadeh, M.E., Stieber, M., Haidl, G., Schmidt, W. (1997). Sperm count in ejaculates and after sperm selection with discontinuous percoll gradient centrifugation technique, as a prognostic index of IVF outcome. *Arch. Gynecol. Obstet.* 259, 125-131.

Haidl, G., Schill, W.-B. (1993). Sperm morphology in fertile men. *Arch. Androl.* 31, 153-157.

Handrow, R.R., Lenz, R.W., Ax, R.L. (1982). Structural comparison among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1326-1332.

Harrison, R.A.P., Fléchon, J.-E., Brown, C.R. (1982). The localization of acrosin and proacrosin in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 66, 349-358.

Harvey, W. (1651). *Exercitationes de Generatione Animalium*. O. Pulleyn, London.

Hedrick, J.L., Urch, U.A., Hardy, D.M. (1988). The structure-function properties of the sperm enzyme acrosin. In: Shoemaker, S., Sonnet, P., Whitaker, J. (eds.) *Enzymes in Agricultural Biotechnology*, Washington, D.C.: ACS Books, pp. 55-73.

Henkel, R., Franken, D.R., Habenicht, U.-F. (1998a). Zona pellucida as physiological trigger for the induction of acrosome reaction. *Andrologia* (accepted), 10.

Henkel, R., Ichikawa, T., Sánchez, R., Miska, W., Ohmori, H., Schill, W.B. (1997). Differentiation of ejaculates showing reactive oxygen species production by spermatozoa or leukocytes. *Andrologia* 29, 295-301.

Henkel, R., Müller, C., Miska, W. (1998b). Induction of the acrosome reaction by low temperature is comparable to physiological induction by human follicular fluid. *Andrologia* 30, 159-161.

Henkel, R., Müller, C., Miska, W., Gips, H., Schill, W.-B. (1993). Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive for fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 8, 2128-2132.

Henkel, R., Müller, C., Miska, W., Schill, W.-B., Kleinstein, J., Gips, H. (1995). Determination of the acrosin activity of human spermatozoa by means of gelatinolytic technique: A simple, predictive method useful for IVF. *J. Androl.* 16, 272-277.

Henkel, R., Schaller, J., Glander, H.-J., Schill, W.-B. (1996). Low expression of adhesion molecules and matrix proteins in patients showing poor penetration in zona-free hamster oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 335-339.

Henkel, R., Schill, W.-B. (1998). Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia* (accepted).

Henkel, R., Stalf, T., Miska, W. (1992). Isolation and partial characterization of the outer dense fiber proteins from human spermatozoa. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 685-689.

Hertig, A., Rock, J., Adams, E. (1956). A description of 34 human ova within the first seventeen days of development. *Am. J. Anat.* 98, 435-459.

Hertwig, O. (1876). Beiträge zur Kenntnis der Bildung, Befruchtung und Teilung des tierischen Eis. *Morphol. Jahrb.* 1, 347-434.

Hinrichsen-Kohane, A.C., Hinrichsen, M.J., Schill, W.-B. (1984). Molecular events leading to fertilization - A review. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)* 42, 51-67.

Hofmann, N. (1987). Wege zur Andrologie. Einführung in die Praxis. Erster Teil. Ditzgen Druck und Verlags-GmbH.

Hofmann, N., Freundl, G., Florack, M. (1985). Die Formstörungen der Spermatozoen im Sperma und Zervikalschleim als Spiegel testikulärer Erkrankungen. *Gynäkologe* 18, 189-192.

Hofmann, N., Haider, S.G. (1985). Neue Ergebnisse morphologischer Diagnostik der Spermatogenesestörungen. *Gynäkologe* 18, 70-80.

Hofmann, N., Hilscher, B., Bierling, C. (1990). Quantitative Untersuchungen der Korrelation von Störungen der Chromatinkondensation mit der Spermatozoenmorphologie. *Fertilität* 6, 208-213.

Honig, S., Thompson, S., Lipshultz, L.I. (1993). Reassessment of male factor infertility, including the varicocele, sperm penetration assay, semen analysis and in vitro fertilization. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 5, 245.

Hotchkiss, R.S. (1945). Fertility in Men. In: William Heinemann Medical Books, London.

Huszar, G., Parish, F., Corrales, M. (1988). HOS and supravital staining in the initial and migrated sperm fractions of normospermic and oligospermic specimens. *J. Androl.* 9, 45-50.

Jadot-Van de Casseye, M., Schoysman, R., Smets, G., Gepts, W. (1980). Ultrastructural aspects of asthenospermia. *Int. J. Androl.* 3, 15-22.

Jaiswal, B.S., Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspar, I., Eisenbach, M. (1998). Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS Lett.* 427, 309-313.

Jamil, K., White, G. (1981). Induction of the acrosome reaction with ionophore A23187 and calcium. *Arch. Androl.* 7, 283-292.

Jeulin, C., Feneux, D., Serres, C., Jouannet, P., Guillet-Rosso, F., Belaisch-Allart, J., Frydman, R., Testart, J. (1986). Sperm factors related to failure of human in-vitro fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 76, 735-744.

Jeyendran, R.S., van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.B. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70, 219-228.

Jeyendran, R.S., van der Ven, H.H., Kennedy, W.P., Heath, E., Perez-Pelaez, M., Sobrero, A.J. (1985). Acrosomless sperm, a cause of primary male infertility. *Andrologia* 17, 31-36.

Jeyendran, R.S., van der Ven, H.H., Zaneveld, L.J.B. (1992). The hypo-osmotic swelling test: an update. *Arch. Androl.* 29, 105-116.

Joel, C.A. (1971). Historical survey of research on spermatozoa from antiquity to the present. In: *Fertility Disturbances in Men and Women*, Joel, C.A. (ed), Karger, Basel, Schweiz, pp 3-47.

Jones, R., Brown, C.R., Lancaster, R.T. (1988). Carbohydrate-binding properties of boar sperm proacrosin and assessment of its role in sperm-egg recognition and adhesion during fertilization. *Development* 102, 781-792.

Jones, R. (1991). Interaction of zona pellucida, sulphated carbohydrates and synthetic polymers with proacrosin, the putative egg-binding protein from mammalian spermatozoa. *Development* 111, 1155-1163.

Kaneko, S., Moriwaki, C. (1981). Studies on acrosin. I. Purification and characterization of boar acrosin. *J. Pharmacobiodyn.* 4, 20-27.

Katz, D.F., Davis, R.O., Drobnis, E.Z., Overstreet, J.W. (1993). Sperm motility measurement and hyperactivation. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 11, 27-39.

Katz, D.F., Diel, L., Overstreet, J.W. (1982). Differences in the movement of morphologically normal and abnormal human seminal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 26, 566-570.

Katz, D.F., Overstreet, J.W., Samuels, S.J., Niswander, P.W., Blood, T.D., Lewis, E. (1986). Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J. Androl.* 7, 203-210.

Katz, D.F., Yanagimachi, R. (1981). Movement characteristics of hamster and guinea pig spermatozoa upon attachment to the zona pellucida. *Biol. Reprod.* 25, 785-791.

Kennedy, W.P., Kaminski, J.M., Van der Ven, H.H., Jeyendran, R.S., Reid, D.S., Blackwell, J., Bielfeld, P., Zaneveld, L.J.D. (1989). A simple, clinical assay to evaluate the acrosin activity of human spermatozoa. *J. Androl.* 10, 221-231.

Klemm, U., Müller-Esterl, W., Engel, W. (1991). Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease. *Hum. Genet.* (Review article) 87, 635-641.

Köhler, J.K., De Curtis, I., Stechener, M.A., Smith, D. (1982). Interaction of human sperm with zona free hamster eggs. A freeze fracture study. *Gamete Res.* 6, 371-386.

Köhn, F.M., Mack, S.R., Hashish, Y.A., Anderson, R.A., Zaneveld, L.J. (1996). Paramagnetic beads coated with *Pisum sativum* agglutinin bind to human spermatozoa undergoing the acrosome reaction. *Andrologia* 28, 231-239.

Köhn, F.M., Mack, S.R., Schill, W.B., Zaneveld, L.J. (1997). Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, *Pisum sativum* agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. *Hum. Reprod.* 12, 714-721.

Köhn, F.M., Miska, W., Schill, W.-B. (1995). Release of angiotensin-converting enzyme (ACE) from human spermatozoa during capacitation and acrosome reaction. *J. Androl.* 16, 259-265.

Koukoulis, G.N., Vantman, D., Dennison, L., Banks, S.M., Sherins, R.J. (1989). Low acrosin activity in a subgroup of men with idiopathic infertility does not correlate with sperm density, percent motility, curvilinear velocity, or linearity. *Fertil. Steril.* 52, 120-127.

Kovalski, N.N., de Lamirande, E., Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavenger. *Fertil. Steril.* 58, 809-816.

Krausz, C., Bonaccorsi, L., Maggio, P., Luconi, M., Criscuoli, L., Fuzzi, B., Pellegrini, S., Forti, G., Baldi, E. (1996). Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 11 (8), 1661-1667.

Kremer, J., Jager, S. (1990). The significance of the zona-free hamster oocyte test for the evaluation of male fertility. *Fertil. Steril.* 54, 509-512.

Kremling, H., Keime, S., Wilhelm, K., Adham, I.M., Hameister, H., Engel, W. (1991). Mouse proacrosin gene: nucleotide sequence, diploid expression, and chromosomal localization. *Genomics* 11, 828-834.

Kruger, T.F., Acosta, A.A., Simms, K.F., Swanson, R.J., Matta, J.F., Oehninger, S. (1988a). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 49, 112.

Kruger, T.F., Du Toit, T.C., Franken, D.R., Acosta, A.A., Oehninger, S.C., Menkveld, R., Lombard, C.J. (1993). A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. *Fertil. Steril.* 59, 202-209.

Kruger, T.F., Du Toit, T.C., Franken, D.R., Menkveld, R., Lombard, C.J. (1995). Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS. *Fertil. Steril.* 63, 134-141.

Kruger T.F., Haque, D., Acosta, A.A., Pleban, P., Swanson, R.J., Simmson, K.F., Matta, J.F., Morshedi, M., Oehninger, S. (1988b). Correlation between sperm morphology, acrosin and fertilization in an IVF program. *Arch. Androl.* 20, 337-345.

Kruger T.F., Swanson, R.J., Hamilton, M., Simmson, K., Acosta, A.A., Matta, J.F. (1988c). Abnormal sperm morphology and other semen parameters related to the outcome of the hamster oocyte human sperm penetration assay. *Int. J. Androl.* 11, 107-113.

Kruger, T.F., Lacquet, F.A., Sarmiento, C.A., Menkveld, R., Ozgur, K., Lombard, C.J., Franken, D.R. (1996). A prospective study on the predictive value of normal sperm morphology as evaluated by computer (IVOS). *Fertil. Steril.* 66, 285-291.

Lacquet, F.A., Kruger, T.F., Du Toit, T.C., Lombard, C.J., Sanchez Sarmiento, C.A., De Villiers, A., Coetzee, K. (1996). Slide preparation and staining procedure for reliable results using computerized morphology. *Arch. Androl.* 36, 133-138.

Lalonde, L., Langlais, J., Antake, O., Chapdelaine, A., Roberts, K.D., Bleau, G. (1988). Male infertility associated with round-headed acrosomless spermatozoa. *Fertil. Steril.* 49, 316-321.

Langlais, J., Roberts, D. (1985). A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12, 183-224.

Leblond, C.P., Clermont, Y. (1952). Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the „Periodic Acid-Fuchsin Sulfurous Acid“ technique. *Am. J. Anat.* 90, 167-215.

Lee, M.A., Trucco, G.S., Bechtol, K.B., Wummer, N., Kopf, G.S., Blasco, L. (1987). Capacitation and acrosome reaction in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil. Steril.* 48, 649-658.

Le Lannou, D., Blanchard, Y. (1988). Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J. Reprod. Fertil.* 84, 551-556.

Levin, R.M., Shofer, J., Wein, A.J., Greenberg, S.H. (1981). ATP concentration of human spermatozoa: lack of correlation with sperm motility. *Andrologia* 13 (5), 468-472.

Leyton, L., Saling, P. (1989). 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 57, 1123-1130.

Lipshultz, L.I., Howards, S.S. (eds.): Infertility in the Male. 3ed. Mosby, St. Louis, MO.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1988). The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with pisum sativum agglutinin correlates with fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 50, 288-293.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1990). Relationships between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. *Hum. Reprod.* 5, 298-303.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1992a). Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 58, 465.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1992b). Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *J.Reprod. Fertil.* 94, 71-84.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1993). Inhibition of acrosin activity with a Trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucida. *Biol. Reprod.* 48, 340-348.

Liu, D.Y., Baker, H.W.G. (1996). A simple method for assessment of the human acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction. *Human. Reprod.* 11, 551-557.

Liu, D.Y., Clarke, G.N., Baker, H.W.G. (1991). Inhibitors of human sperm zona pellucida and sperm oolemma binding by antisperm antibodies. *Fertil. Steril.* 56, 764.

Liu, D.Y., Clarke, G.N., Lopata, A., Johnston, W.I.H., Baker, H.W.G. (1989a). A sperm-zona pellucida binding test and in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 52, 281-287.

Liu, D.Y., Du Plessis, Y.P., Nayudu, P.L., Johnston, W.I.H., Baker, H.W.G. (1988a). The use of in vitro fertilization to evaluate putative tests of human sperm function. *Fertil. Steril.* 49, 272-277.

Liu, D.Y., Elton, R.A., Johnston, W.I.H., Baker, H.W.G. (1987a). Spermatozoal nuclear chromatin decondensation in vitro: a test for sperm immaturity. Comparison with results of human in vitro fertilisation. *Clin. Reprod. Fertil.* 5, 191-201.

Liu, D.Y., Jennings, M.G., Baker, H.G.W. (1987b). Correlation between defective motility (asthenozoospermia) and ATP reactivation of demembranated human spermatozoa. *J. Androl.* 8, 349-353.

Liu, D.Y., Lopata, A., Johnston, W.I.H., Baker, H.W.G. (1988b). A human sperm-zona binding test using oocytes that failed in vitro. *Fertil. Steril.* 50, 782-788.

Liu, D.Y., Lopata, A., Johnston, W.I.H., Baker, H.W.G. (1989b). Human sperm-zona binding, sperm characteristics and in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 4, 696-701.

Lucas, H., Bercegeay, S., Le Pendu, J., Jean, M., Mirallie, S., Barriere, P. (1994). A fucose-containing epitope potentially involved in gamete interaction of the human zona pellucida. *Hum. Reprod.* 9, 1532-1538.

MacLeod, J. (1964). Human seminal cytology as a sensitive indicator of the germinal epithelium. *Int. J. Fertil.* 9, 281-295.

MacLeod, J. (1966). The clinical implications of deviations in human spermatogenesis as evidenced in seminal cytology and experimental production of these deviations.

Ex. Med. Int. Cong. Ser. No. 133, Proceeding of the Fifth Congress on Fertility and Sterility, Stockholm, 16-22 June, pp. 563-574.

MacLeod, J. (1970). The significance of deviations in human sperm morphology. In: *The Human Testis*. Rosenberg, E., Paulsen, C.A. (eds.), Plenum Press, New York, London, pp 481-494.

MacLeod, J. (1971). Human Male Infertility. *Obstet. Gynecol. Surv.* 26, 325.

MacLeod, J., Gold, R.Z. (1952). The male factor in fertility and infertility. IV. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. *Fertil. Steril.* 2, 394-414.

Macomber, D., Sanders, M.B. (1929). The spermatozoa count. Its value in the diagnosis, prognosis and treatment of sterility. *N. Engl. J. Med.* 200, 981-1004.

Mahi, C., Yanagimachi, R. (1973). The effects of temperature, osmolarity and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 35, 55-66.

Makler, A. (1988). Modern methods in semen analysis evaluation. In: *Progress in infertility*. Behrman, S.J., Kistner, R.W. Jr., Patton, G.W., (eds.), Little Brown and Company, Boston, pp. 633-661.

Marsh, S.K., Bolton, V.L., Braude, P.R. (1987). The effect of morphology on the ability of human spermatozoa to penetrate zona-free hamster oocytes. *Hum. Reprod.* 2, 499-503.

Marushige, Y., Marushige, K. (1978). Dispersion of mammalian sperm chromatin during fertilization: an in vitro study. *Biochem. Biophys. Acta* 519, 1-22.

McGowan, M.P., Baker, H.W.G., Kovacs, G.T., Rennie, G. (1983). Selection of high fertility donors for artificial insemination programmes. *Clin. Reprod. Fertil.* 2, 269-274.

Meizel, S. (1978). The mammalian sperm acrosome reaction, a biochemical approach. In: *Developments in mammals*, vol.3, Johnson, M.H. (eds.), North Holland, Amsterdam; pp. 1-64.

Meizel, S. (1985). Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with mammalian sperm surface. *Am. J. Anat.* 174, 285-302.

Meizel, S., Working, P.K. (1980). Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome reaction by catecholamines in vitro. *Biol. Reprod.* 22, 211-216.

Menkveld, R. (1987). An investigation of environmental influences on spermatogenesis and semen parameters. Ph.D. Dissertation, Faculty of Medicine, University of Stellenbosch, South Africa.

Menkveld, R., Franken, D.R., Kruger, T.F., Oehninger, S., Hodgen, G.D. (1991). Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Molec. Reprod. Develop.* 30, 346-352.

Menkveld, R., Kruger, T.F. (1990). Basic semen analysis. In: *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction*. Acosta, A.A., Swanson, R.J., Ackerman, S.B., Kruger, T.F., van Zyl, J.A., Menkveld, R. (eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 68-84.

Menkveld, R., Kruger, T.F., Oettle, E.E., Swanson, R.J., Oehninger, S., Acosta, A.A. (1991). Basic principles and practical aspects. In: *Atlas of Human Sperm Morphology*. Menkveld, R., Oettle, E.E., Kruger, T.F., Swanson, R.J., Oehninger, S. (eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1-6.

Menkveld, R., Lacquet, F.A., Kruger, T.F., Lombard, C.J., Sanchez Sarmiento, C.A., de Villiers, A. (1997). Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia* 29, 1-7.

Menkveld, R., Stander, F.S.H., Kotze, T.J. vW., Kruger, T.F., van Zyl, J.A. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to strict criteria. *Hum. Reprod.* 5, 586-592.

Miska, W., Fehl, P., Henkel, R. (1994). Biochemical and immunological characterization of the acrosome reaction-inducing substance of human follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 125-129.

Moench, G.L., Holt, H. (1931). Sperm morphology in relation to fertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 22, 199-210.

Mohsenian, M., Syner, F.N., Moghissi, K.S. (1982). A study of sperm acrosin in patients with unexplained infertility. *Fertil. Steril.* 37, 223-229.

Moore, A., Penfold, L.M., Johnson, J.L., Latchman, D.S., Moore, H.D.M. (1993). Human sperm-egg binding is inhibited by peptides corresponding to the core region of an acrosomal serine protease inhibitor. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 280-291.

Morales, P., Llanos, M., Gutierrez, G., Kohen, P., Vigil, P., Vantman, D. (1992). The acrosome-inducing activity of individual hFF samples is highly variable and is related to the steroid content. *Hum. Reprod.* 7, 646-651.

Mordel, N., Dano, I., Epstein-Eldan, M. (1993). Novel parameters of human sperm hypoosmotic swelling test and their correlation to standard spermatogram, total motile sperm fraction, and sperm penetration assay. *Fertil. Steril.* 59, 1276.

Morgentaler, A., Harris, D.H., Fung, M.Y., Powers, R.D. (1993). Sperm morphology as a predictor of IVF results: A comparison of World Health Organization and Tygerberg Methodologies. *Endocr. Fertil. Forum.* 16, 2-3.

Mortimer, D. (1994a). Sperm preparation techniques and iatrogen failures of in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 6, 173-176.

Mortimer, D. (1994b). *Practical Andrology*. Oxford, Oxford University Press.

Mortimer, D., Camenzind, A.R. (1989). The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro. *Hum. Reprod.* 4, 169-174.

Mortimer, D., Curtis, E.F., Miller, R.G. (1987). Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosome membrane of the human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 81, 127-135.

Moruzzi, J.F., Wyrobek, A.J., Mayall, B.H., Gledhill, B.J. (1988). Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis. *Fertil. Steril.* 50, 142-152.

Mukerjee, A.B., Lippes, J. (1972). Effect of human follicular and tubular fluids on human, mouse and rat spermatozoa in vitro. *Can. J. Genet. Cytol.* 14, 167-174.

Müller, C.H. (1992). The andrology laboratory in an assisted reproductive technologies program. Quality assurance and laboratory methodology. *J. Androl.* 13, 349.

Müller-Esterl, W., Fritz, H. (1981). Sperm acrosin. *Meth. Enzymol.* 80, 621-629.

Neuwinger, J., Behre, H.M., Nieschlag, E. (1990). External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil. Steril.* 54, 308.

Niederberger, C.S., Lamb, D.J., Glinz, M., Lipshultz, L.I., Scully, N.F. (1993). Tests of sperm function for evaluation of the male: Penetrak and Tru-Trax. *Fertil. Steril.* 60, 319-323.

Nuzzo, N.A., Anderson, R.A., Jr., Zaneveld, L.J.D. (1990). Proacrosin activation and acrosin release during the guinea pig acrosome reaction. *Molec. Reprod. Develop.* 25, 52-60.

Oehninger, S., Acosta, A.A., Kruger, T.F., Veeck, L.L., Flood, J., Jones, H.W., (1988a). Failure of fertilization in in vitro fertilization: The 'occult' male factor. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transf.* 5, 181-187.

Oehninger, S., Acosta, A.A., Morshedi, M., Veeck, L., Swanson, R.J., Simmons, K., Rosenwaks, Z. (1988b). Corrective measures and pregnancy outcomes in in vitro fertilizations in patients with severe sperm morphology abnormalities. *Fertil. Steril.* 50, 283.

Oehninger, S., Blachmore, P., Morshedi, M., Sueldo, C., Acosta, A.A., Alexander, N.J. (1994). Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone-induced) in spermatozoa of infertile men with severe teratozoospermia. *Fertil. Steril.* 61, 349-354.

Oehninger, S., Stecker, J., Acosta, A. (1992). Male infertility: the impact of assisted reproductive technologies. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 4, 185.

Oehninger, S., Veeck, L., Franken, D.R., Kruger, T.F., Acosta, A.A., Hodgen, G.D. (1991). Human preovulatory oocytes have a higher sperm-binding ability than immature oocytes under hemizona assay conditions: evidence supporting the concept of "zona maturation". *Fertil. Steril.* 55, 1165-1170.

Oliphant, G., Cabot, C.L., Singhas, C.A. (1977). Nature of the rabbit acrosome reaction-inducing activity of follicular fluid. *J. Reprod. Fert.* 50, 245-250.

Oliphant, G., Reynolds, A.B., Thomas, T.S. (1985). Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat.* 174, 269-283.

Olson, G.E., Hamilton, D.W. (1978). Characterization of the surface glycoproteins of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* 19, 26-35.

Oosterhuis, G.J., Hampsink, R.M., Michgelsen, H.W., Vermes, I. (1996). Hypo-osmotic swelling test: a reliable screening assay for routine semen specimen quality screening. *J. Clin. Lab. Anal.* 10, 209-212.

O'Shea, D.L., Odem, R.R., Cholewa, C., Gast, M.J. (1993). Long-term follow-up of couples after hamster egg penetration testing. *Fertil. Steril.* 60, 1040.

Osman, R.A., Andris, M.L., Jones, A.D., Meizel, S. (1989). Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 828-822.

Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., van Steirteghem, A.C. (1992). Pregnancies after intra-cytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340,17-19.

Pampiglione, J.S., Tan, S.L., Campbell, S. (1993). The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 59, 1280.

Papanicolaou, G.N. (1942). A new procedure for staining vaginal smears. *Science* 95, 438-439.

Pleban, P., Zaneveld, L.J., Jeyendran, R.S. (1990). Tests of spermatozoa function: acrosin. In: Acosta, A.A., Swanson, R.J., Ackerman, S.B., Kruger, T.F., Van Zyl, J.A., Menkveld, R. (eds.) *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 96-101.

Polakoski, K.L.K., Siegel, M.S. (1986). The Proacrosin-Acrosin System. In: Paulson, J.D., Negro-Vilar, A., Lucena, E., Martini, L. (eds.), *Andrology, Male Fertility and Sterility*. Academic Press, Orlando, FL; pp. 359-375.

Polakoski, K.L.K., Zahler, W.L., Paulson, J.D. (1977). Demonstration of proacrosin and quantitation of acrosin in ejaculated human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 28, 668-670.

Pousette, A., Akerlof, E., Rosenborg, L., Fredricsson, B. (1986). Increase in progressive motility and improved morphology of human spermatozoa following their migration through Percoll gradients. *Int. J. Androl.* 9, 1-13.

Purvis, K., Rui, H., Scholberg, A., Hesla, S., Clausen, O.P. (1990). Application of flow cytometry to studies on the human acrosome. *J. Androl.* 11 (4), 361-366.

Ravnik, S.E., Albers, J.J., Müller, C.H. (1993). A novel view of albumin-supported sperm capacitation: role of lipid transfer protein-1. *Fertil. Steril.* 59, 629-638.

Riedel, H.H., Wellnitz, K., Steinberg, R., Mettler, L. (1989). Modification of the penetration rate of human spermatozoa in the zona pellucida free hamster oocyte system by the use of polyclonal and monoclonal antibodies to human sperm. *Zentralbl. Gynäkol.* 111, 1425-1437.

Robertson, L., Wolf, D.P., Tash, J.S. (1988). Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol. Reprod.* 39, 797-805.

Rochwerger, L., Cohen, D.J., Cuasnicu, P.S. (1992). Mammalian sperm-egg fusion: the rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev. Biol.* 153, 83-90.

Rogers, B.J., Bentwood, B.J. (1982). Capacitation, acrosome reaction and fertilization. In: Zaneveld, L.J.D., Chatterton, R.T. (eds.), *Biochemistry of Mammalian Reproduction*, John Wiley, New York; p. 203.

Rogers, B.J., Bentwood, B.J., Van Campden, H., Helmbrecht, G., Soderahl, D., Hale, R.W. (1983). Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *J. Androl.* 4, 119-125.

Rogers, B.J., Parker, R.A. (1991). Relationship between the human sperm hypo-osmotic swelling test and sperm penetration assay. *J. Androl.* 12, 152-158.

Ross, L.S. (1983). Diagnosis and treatment of infertile men: A clinical perspective. *J. Urol.* 130, 847-854.

Saling, P.M., Sowinski, J., Storey, B.T. (1979). An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zona pellucida in vitro: sequential relationship to the acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 209, 229-238.

Sánchez, R., Baltes, P., Pena, P., Villegas, J., Henkel, R., Miska, W. (1995). Immunohistochemical localization of a CBG-like SERPIN in human fallopian tubes at various reproductive stages. Immunhistochemische lokalisierung eines CBG-ähnlichen SERPINs im menschlichen Eileiter zu verschiedenen Zeiten des Zyklus. *Reprod. Dom. Anim.* 30, 449.

Sánchez, R., Concha, M., Töpfer-Petersen, E., Schill, W.-B. (1993). Demonstration of acrosomal membranes using the hypoosmotic swelling test. *Andrologia* 25, 1-2.

Sánchez, R., Töpfer-Petersen, E., Aitken, R.J., Schill, W.-B. (1991). A new method for evaluation of the acrosome reaction in viable human spermatozoa. *Andrologia* 23, 197-203.

Sathananthan, A.H., Trounson, A.O. (1982). Ultrastructure of cortical granulae release and zona interaction in monospermic and polyspermic human ova fertilized in vitro. *Gamete Res.* 6, 225-234.

Schierbeck, A. (1959). Measuring the invisible world: the life and works of Antoni van Leeuwenhoek, New York, Aberlard-Schuman, pp. 81-107.

Schill, W.-B. (1973). Acrosin activity in human spermatozoa: Methodological investigations. *Arch. Derm. Forsch.* 248, 257-273.

Schill, W.-B. (1974). Quantitative determination of acrosin activity in human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 25, 703-712.

Schill, W.-B. (1975). Significance of proteolytic sperm enzymes for fertility. *Hautarzt* 26, 514-523.

Schill, W.-B. (1990). Determination of active, non-zymogen acrosin, proacrosin and total acrosin in different andrological patients. *Arch. Dermatol. Res.* 282, 335-342.

Schill, W.-B. (1991). Some disturbances of acrosomal development and function in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 6, 669-678.

Schill, W.-B. (1994). Andrology-historical retrospect and future development. *Fortschr. Med.* 112 (34), 496-499.

Schill, W.-B. (1995). Survey of medical therapy in andrology. *Int. J. Androl.* 18 (Suppl 2), 56-62.

Schill, W.-B., Feifel, M. (1984). Low acrosin activity in polyzoospermia. *Andrologia* 16, 589-591.

Schill, W.-B., Feifel, M., Fritz, H. (1982). Acid extraction of acrosin from human spermatozoa pretreated by different physiochemical methods. *Arch. Dermatol. Res.* 273, 273-285.

Schill, W.-B., Feifel, M., Fritz, H., Hammerstein, J. (1981). Inhibitors of acrosomal proteinase as antifertility agents. A problem of acrosomal membrane permeability. *Int. J. Androl.* 4, 25-38.

Schill, W.-B., Henkel, R., Miska, W. (1994). Biotests of sperm function. In: Fertility and Sterility. Progress in Research and Practice. The proceedings of the XIV. World Congress on Fertility and Sterility, Caracas, Venezuela, November 1992; Rodriguez-Armaz, O., Baumgartner, W., Burgos-Briceno, L. (eds.). The Parthenon Publishing Group, London, New York, pp. 3-17.

Schill, W.-B., Miska, W. (1992). Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions. *Andrologia* 24, 69-75.

Schill, W.-B., Miska, W. (1994). Possible effects of the kallikrein-kinin system on male reproductive functions. *Andrologia* 24, 69-73.

Schill, W.-B., Preissler, G., Dittmann, B., Müller, W.P. (1979). Effect of pancreatic kallikrein, sperm acrosin and high molecular weight (HMG) kininogen on cervical mucus penetration ability of seminal plasma-free human spermatozoa. *Adv. Exp. Med. Biol.* 120B, 305-310.

Schill, W.-B., Töpfer-Petersen, E., Heissler, E (1988). The sperm acrosome: functional and clinical aspects. *Hum. Reprod.* 3, 139-145.

Schrader, S.M., Jeyendran, R.S., Perez-Pelaez, M., Zaneveld, L.J.D. (1983). Evaluation of the physical and functional integrity of the human sperm membrane (abstract). *J. Androl.* 4, 48.

Schoysman, R., Gerris, J. (1983). Twelve-year follow-up study of pregnancy rates in 1921 couples with idiopathically impaired male fertility. *Acta. Eur. Fertil.* 14, 51-55.

Seidel, G.E., Smith, A.L. (1986). Exposure to synthetic polymers induces attachment of spermatozoa to zonae pellucida but penetration occurs only after exposure to serum albumin in the mouse. *Biol. Reprod.* 34 (Suppl. 1), 191-199.

Shalgi, R., Dor, J., Rudak, E., Lusky, A., Goldman, B., Mashiach, S., Nebel, L. (1985). Penetration of sperm from teratozoospermic men into zona-free hamster eggs. *Int. J. Androl.* 8, 285-294.

Sharma, R., Hogg, J., Bromham, D.R. (1993). Is spermatozoan acrosin a predictor for fertilization and embryo quality in the human? *Fertil. Steril.* 60, 881-887.

Shinohara, H., Yanagimachi, R., Srivastana, P.N. (1985). Enhancement of the acrosome reaction of hamster spermatozoa by the proteolytic enzymes, kallikrein, trypsin, and chymotrypsin. *Gamete Res.* 11, 19-28.

Shur, B.D., Hall, N.G. (1982). A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to egg zona pellucida. *J. Cell. Biol.* 95, 574-579.

Sigman, M., Lipshultz, L.I., Howards, S.S. (1991). Evaluation of the subfertile male. In: Lipshultz, L.I., Howards, S.S. (eds.): *Infertility in the Male*. Churchill Livingstone, New York, p. 179.

Siiteri, J.E., Dandekar, P.V., Meizel, S. (1988). Human sperm acrosome reaction-initiating activity associated with the human cumulus oophorus and mural granulosa cells. *J. Exp. Zool.* 246, 41-80.

Silber, S.J. (1989). The relationship of abnormal semen parameters to male infertility. *Human. Reprod.* 4, 947-953.

Singer, S.L., Lambert, H., Overstreet, J.W., Hanson, F.W., Yanagimachi, R. (1985). The kinetics of human sperm binding to the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte in vitro. *Gamete Res.* 12, 29-39.

Sjoblom, P., Coccia, E. (1989). On the diagnostic value of the hypo-osmotic sperm swelling test in an in vitro fertilization (IVF) program. *In Vitro Fertil. Embryol. Transfer.* 6, 41-43.

Smith, R., Madariaga, M., Bustos Obregon, E. (1992). Reappraisal of the hypo-osmotic swelling test to improve assessment of seminal fertility status. *Int. J. Androl.* 15, 5-13.

Smullen, L.A., Taylor, C.T., Ankers, L., Kingsland, C.R. (1992). Acrosome reaction and failed fertilization. *Hum. Reprod.* 7 (Suppl 2), 198.

Sokol, R.Z., Sparkes, R. (1987). Demonstrated paternity in spite of severe idiopathic oligospermia. *Fertil. Steril.* 47, 356-358.

Song, B.L., Peng, D.R., Li, H.Y., Shang, G.H., Zhang, J., Li, L.K. (1991). Evaluation of the effect of butyl p-hydroxybenzoate on the proteolytic activity and membrane function of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 91, 435-440.

Speert, H. (1993). Essays in eponymig. Obstetric and gynecologic milestones. Macmullan, NY.

Srivastava, P.N., Akruk, S.R., Williams, W.L. (1979). Dissolution of rabbit zona by sperm acrosomal extracts: effects of calcium (1). *J. Exp. Zool.* 207, 521-529.

Stalf, T., Henkel, R., Miska, W. (1993). Weitere Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung der Mantelfasern in menschlichen Spermatozoen. *Fertilität* 9, 203-209.

Stambaugh, R. (1976). Acrosomal enzymes and fertilization. In: Moghissi, K.S., Hafez, E.S. (ed.) Biology of mammalian fertilization and implanta. Review.

Stambaugh, R. (1978). Enzymatic and morphological events in mammalian fertilization. *Gamete Res.* 1, 65-85.

Stambaugh, R., Buckley, J. (1970). Comparative studies of the acrosomal enzymes of rabbit, rhesus, monkey, and human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 3, 275-282.

Step toe, P.C., Edwards, R.G (1978). Birth after re-implantation of a human embryo. *Lancet*, 366.

Stock, C.E., Fraser, L.R. (1987). The acrosome reaction in human sperm of proven fertility. *Hum. Reprod.* 2, 109-119.

Storey, B.T., Kopf, G.S. (1991). Fertilization in the mouse. II. Spermatozoa. In: A Comperative Overview of Mammalian Fertilization. (eds.) Dunbar, B.S., O'Rand, M.G. Plenum Press, New York, pp. 167-216.

Swan, M.A., Linck, R.W., Fawcett, D.W. (1980). Structure and function of the undulating membrane in spermatozoan propulsion in the toad. *Bufo marinus*. *J. Cell Biol.* 85, 866-880.

Suarez, S., Wolf, D.P., Meizel, S. (1986). Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res.* 14, 107-121.

Swenson, C.E., Dunbar, B.S. (1982). Specificity of sperm-zona interaction. *J. Exp. Zool.* 219, 97-104.

Takahashi, K., Uchida, A., Kitap, M. (1990). Hypo-osmotic swelling test of sperm. *Arch. Androl.* 25, 225-242.

Takahashi, K., Wetzel, A.M., Goverde, H.J., Bastaans, B.A., Janssen, H.J., Rolland, R. (1992). The kinetics of the acrosome reaction of human spermatozoa and its correlation with in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 57, 889.

Talbot, P., Chacon, R.S. (1981). A triple stain technique for evaluating normal acrosome reaction of human sperm. *J. Exp. Zool.* 215, 201-208.

Terquem, A., Dadoune, J.P. (1983). Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin: Evaluation of nuclear maturation. In: *The Sperm Cell*, Andre, J.J. (ed.), The Hague: Martinus Nijhoff Publisher; pp. 249-252.

Tesarik, J. (1985). Comparism of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A 23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J. Reprod. Fert.* 74, 383-388.

Tesarik, J., Carreras, A., Mendoza, C. (1993). Differential sensitivity of progesterone- and zona pellucida-induced acrosome reaction to pertussis toxin. *Molec. Reprod. Develop.* 34, 183-189.

Tesarik, J., Drahorád, J., Peknicová, J. (1988a). Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration. *Fertil. Steril.* 50, 133-141.

Tesarik, J., Kopecny, V. (1986). Late preovulatory synthesis of proteoglycans by the human oocyte and cumulus cells and their secretion into the oocyte-cumulus-complex extracellular matrices. *Histochem.* 85, 523-528.

Tesarik, J., Mendoza, C., Moos, J., Carreras, A. (1992a). Selective expression of a progesterone receptor on the human sperm surface. *Fertil. Steril.* 58, 784-792.

Tesarik, J., Mendoza, C., Moos, J., Fénichel, P., Fehlmann, M. (1992b). Progesterone action through aggregation of the sperm plasma membrane. *FEBS Lett.* 308, 116-120.

Tesarik, J., Pilka, L., Travník, P. (1988b). Zona pellucida resistance to sperm penetration before the completion of human oocyte maturation. *J. Reprod. Fertil.* 83, 483-495.

Tesarik, J., Testart, J. (1989). Human sperm egg interactions and their disorders: implications in the management of infertility. *Hum. Reprod.* 4, 729-741.

The American Fertility Society, Society for Assisted Reproductive Technology: Assisted reproductive technology in the United States and Canada (1994). 1992, results generated from the American Fertility Society/Society of Assisted Reproductive Technology Registry. *Fertil. Steril.* 62, 1121

Töpfer-Petersen, E., Henschen, A. (1987). Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase. *FEBS Lett* 226, 18-42.

Töpfer-Petersen, E., Volcker, C.H., Heissler, E., Schill, W.-B. (1987). Absence of the acrosome reaction in polyzoospermia. *Andrologia* 19, 225-228.

Trounson, A.O., Webb, J. (1984). Fertilization of human oocytes following reinsemination in vitro. *Fertil. Steril.* 41, 816-819.

Tummon, I.S., Yuzpe, A.A., Daniel, S.A.J., Deutsch, A. (1991). Total acrosin activity correlates with fertility potential after fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 56, 933-938.

Urch, U.A., Patel, H. (1991). The interaction of boar sperm proacrosin with its natural substrate, the zona pellucida, and with polysulfated polysaccharides. *Development* 111, 1165-1172.

Urch, U.A., Wasrdrip, N.J., Hedrick, J.L. (1985a). Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *J. Exp. Zool.* 233, 479-483.

Urch, U.A., Wasrdrip, N.J., Hedrick, J.L. (1985b). Proteolysis of the zona pellucida by acrosin: the nature of the hydrolysis products. *J. Exp. Zool.* 236, 239-243.

Van den Saffele, J., Vermeulen, L., Schoonjans, F., Comhaire, F.H. (1992). Evaluation of the hypo-osmotic swelling test in relation with advanced methods of semen analysis. *Andrologia* 24, 213-217.

van der Ven, H.H., Jeyendran, R.S., Al-Hasani, S., Perez-Pelaez, M., Diedrich, K., Zaneveld, L.J.D. (1986). Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (Hypoosmotic Swelling Test) and in vitro fertilization. *J. Androl.* 7, 190-196.

van der Ven, H.H., Kaminski, J., Bauer, L., Zaneveld, L.J.D. (1985). Inhibition of human sperm penetration into zona-free hamster oocytes by proteinase inhibitors. *Fertil. Steril.* 43 (4), 609-616.

van der Ven, H.H., Kennedy, W.P., Grün, K., Jeyendran, R.S., Schlebusch, H., Krebs, D. (1987). Acrosin: a predictor of in vitro fertilizing potential of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2 (Suppl. 1), 115.

Van Deurs, B., Lastein, U. (1973). Ultrastructure of the spermatozoa of the teleost *Pantodon buchholzi* Peters, with particular reference to the midpiece. *J. Ultrastruct. Res.* 42, 517-533.

Van Duin, M., Polman, J.E.M., de Breet, I.T.M., van Ginneken, K., Bunschoten, H., Grootenhuis, A., Brindle, J., Aitken, J.R. (1994). Recombinant human ZP protein ZP3 produced in Chinese hamster ovary cell induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.* 50, 607-617.

Van Kooij, R.T., Balerna, M., Raotti, A., Campana, Z. (1986). Oocyte penetration and acrosome reactions of human sperm. II. Correlation with other seminal parameters. *Andrologia* 18, 503-508.

Vantman, D., Koukoulis, G., Dennison, L., Zinaman, M., Sherins, R.J. (1988). Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination. *Fertil. Steril.* 49, 510-515.

Van Zyl, J.A., Menkveld, R., Kotze, T.J.vW., van Niekerk, W.A. (1976). The importance of spermiograms that meet the requirements of national standards and the most important factors that influence semen parameters. Proceedings of the 17th Congress of the International Urological Society, Vol.2, Diffusion Dion Editeurs, Paris, pp. 263-271.

Van Zyl, J.A. (1972). A review of the male factor in 231 infertile couples. *S. Afr. J. Obstet. Gynecol.* 10, 17-23.

Visconti, P.E., Galantino-Homer, H., Moore, G.D., Bailey, J.L., Ning, X., Fornes, M., Kopf, G.S. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *J. Androl.* 19, 242-248.

Von Bernhardt, R., de Ioannes, A.E., Blanco, L.P., Herrera Bustos-obregon, E., Vigil, P. (1990). Round-headed spermatozoa: a model to study the role of the acrosome in early events of gamete interaction. *Andrologia* 22, 12-20.

Vuento, M., Kuusela, R., Virkki, M., Koskimies, A. (1984). Characterization of fibronectin on human spermatozoa. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365, 757-762.

Wang, C., Chan, S.Y.W., Ng, M., So, W.W.K., Tsoi, W., Lo, T., Leung, A. (1988). Diagnostic value of sperm function test and routine semen analysis in fertile and infertile men. *J. Androl.* 9, 384-389.

Wassarman, P.M. (1987). The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235, 553-560.

Welker, B., Bernstein, G.S., Diedrich, K., Nakamura, R.M., Krebs, D. (1988). Acrosomal proteinase activity of human spermatozoa and relation of results to semen quality. *Hum. Reprod.* 3 (Suppl. 2), 75-80.

Wendt, V., Leidl, W., Fritz, H. (1975). The lysis effect of bull spermatozoa on gelatin substrate film methodical investigations. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356, 315-323.

White, D.R., Phillips, D.M., Bedford, J.M. (1990). Factors affecting the acrosome reaction in human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 90, 71-80.

Williams, W.L. (1972). Biochemistry of capacitation of spermatozoa. In: *Biology of mammalian fertilization*, Moghissi, K.S., Hafez, E.S.E. (eds.), CC Thomas, Springfield, Illinois, pp. 43-60.

Williams, W.W. (1937). Spermatoc abnormalities. *N. Engl. J. Med.* 217, 946-951.

Williams, W.W., McGuigan, A., Carpenter, H.D. (1934). The staining and morphology of the human spermatozoa. *J. Urol.* 32, 201-212.

Williams, W.W., Savage, A. (1925). Observations on the seminal micropathology of bulls. *Cornell Vet.* 15, 353-375.

Williamson, R.A., Köhler, J.K., Smith, W.D., Stenchever, M.A. (1984). Ultrastructural sperm tail defects associated with sperm immotility. *Fertil. Steril.* 41, 103-107.

Wilton, L.J., Temple-Smith, P.D., Baker, H.W.G., de Kretser, D.M. (1988). Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil. Steril.* 49, 1052-1058.

Wolf, D.P. (1981). The mammalian egg's block to polyspermy. In: *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Mastroianni, L., Biggers, J.D. (eds.), Raven Press, New York, pp. 183-197.

Wolf, D.P., Bold, J., Byrd, W., Bechtol, K.B. (1985). Acrosome status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 32, 1157-1162.

Wolf, D.P., Byrd, W., Dandekar, P., Quigley, M.M. (1984). Sperm concentration and the fertilization of human eggs in vitro. *Biol. Reprod.* 31, 837-848.

Wolff, H.H., Schill, W.-B., Moritz, P. (1976). Rundköpfige Spermatozoen: Ein seltener andrologischer Befund („Kugelpfahrspermatozoen“, „Globozoospermie“). *Hautarzt* 27, 111-116.

World Health Organization (1980). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Press Concern, Singapore.

World Health Organization (1987). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interactions, Cambridge University Press, Cambridge.

Yang, Y.S., Chen, S.U., Ho, H.N., Chen, H.F., Lien, Y.R., Lin, H.R., Huang, S.C., Lee, T.Y. (1994): Acrosin activity of human sperm did not correlate with IVF. *Arch. Androl.* 32, 13-19.

Yanagimachi, R. (1988). Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction, vol. 1. Knobil, E., Neill, J.D. (eds.), Raven Press, New York; pp. 135-185.

Yanagimachi, R., Nicolson, G.L., Noda, Y.D., Fujimoto, M. (1973). Electron microscopic observations on the distribution of anionic residues in hamster spermatozoa and eggs before and during fertilization. *J. Ultrastruct. Res.* 43, 344-353.

Yanagimachi, R. (1981). Mechanism of Fertilization In Mammals. In Mastroianni, L., Biggers, J.D. (eds.). Fertilization and Embryonic Development in Vitro. Plenum Press, New York, pp. 81-182.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian Fertilization. In: Knobil, E. and Neill, J.D. (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition, Vol. 1., Raven Press, New York, pp. 189-317.

Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., Rogers, B.J. (1976). The use of zona free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15, 471.

Yovich, J.M., Edirisinghe, W.R., Yovich, J.L. (1994). Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: a prospective, double-blind, randomized controlled study. *Fertil. Steril.* 61 (5), 902-910.

Yudin, A.I., Gottlieb, W., Meizel, S. (1988). Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. *Acta. Endocrinol.* 27, 343-355.

Zaini, A., Jennings, M.G., Baker, H.W.G. (1985). Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertil men? *Int. J. Androl.* 8, 427-435.

Zaneveld, L.J.D., DeJonge, C.J. (1991). Mammalian Sperm Acrosomal Enzymes and the Acrosome Reaction. In: Dunbar, B.S., O'Rand, M.G. (eds.). *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. Plenum Press, New York, pp. 63-79.

Zaneveld, L.J.D., DeJonge, C.J., Anderson, R.A., Mack, S.R. (1991). Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum. Reprod.* 6, 1265-1274.

Zaneveld, L.J.D., Jeyendran, R.S. (1988). Modern assessment of semen for diagnostic purpose. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 6, 323-337.

Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T., Kessler, M., Williams, W.L. (1971). Inhibition of fertilization in vivo by pancreatic and seminal plasma trypsin inhibitors. *J. Reprod. Fertil.* 25, 387-392.

Zaneveld, L.J.D., Srivastava, P.N., Williams, W.L. (1970). Inhibition by seminal plasma of acrosomal enzymes in intact sperm. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133, 1172-1174.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADH	Alkoholdehydrogenase
AR	Akrosomreaktion
BAEE	Benzoyl-arginin-ethylester
BWW	Medium nach Biggers, Whitten und Whittingham (1971)
cAMP	cyclisches Adenosin-3,5'-monophosphat
E	Extinktion
ET	Embryotransfer
FR	Fertilisationsrate
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GIFT	gamete intrafallopian transfer
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure
hFF	humane Follikularflüssigkeit
hMG	humanes menopausales Gonadotropin
HOP-Test	Hamster Ovum Penetrations-Test
HOS-Test	Hypoosmotischer Schwelltest
HSA	human serum albumin, menschliches Serumalbumin
HTF	Medium nach Quinn et al. (1985), entspricht in der ionalen Zusammensetzung der menschlichen Tubenflüssigkeit (human tubal fluid)
ICSI	intra-cytoplasmatic sperm injection, Mikroinjektion
i.m.	intramuskulär
IUI	Intrauterine Insemination
IVF	In Vitro Fertilisation
LH	Luteinisierendes Hormon
LHD	Lateral head displacement, seitliche Kopfauslenkung
LIN	Linearität
NAD	β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat Buffered Saline
PROST	Pronukleusstadiumtransfer
r	Korrelationskoeffizient

s.c.	s ubcutan
SEM	s tandard e rror of the m ean, Standardabweichung des Mittelwerts
TEST	intratubarer E mbryo t ransfer
Tris	T ris-(hydroxymethyl)-aminoethan
VAP	a verage- p ath- v elocity, Pfadgeschwindigkeit
VCL	c urve- l inear- v elocity, Spurgeschwindigkeit
VSL	s traight- l inear- v elocity, Progressivgeschwindigkeit
WHO	W orld H ealth O rganization
ZP	Z ona p ellucida

9. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank für das Gelingen meiner Arbeit gilt:

- Herrn Prof. Dr. Dr. Schill für die Vergabe des interessanten Themas dieser Dissertation, für seine freundliche Unterstützung, insbesondere die großzügige Hilfe, die mir durch die uneingeschränkte Nutzung von Laborräumen, der technischen Geräte und all der erforderlichen Materialien in seiner Klinik zuteil wurde.
- Meinem unmittelbaren wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Dr. Henkel, für seine stete Hilfsbereitschaft und große Geduld bei allen wissenschaftlichen Fragen und Diskussionen. Sein motivierendes Interesse und seine tatkräftige Unterstützung, den wissenschaftlichen Kontakt selbst über den Atlantik hinweg mittels modernster Kommunikationsmittel zu sichern, trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.
- Herrn Dr. Miska für sein Engagement und seine freundliche und kritische Mithilfe, die den Fortgang meiner Arbeit positiv beeinflussten.
- Den Herren Prof. Dr. Gips, Dr. Kanagha, Dr. Kleinstein und Dr. Turley sowie der Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsmedizin an der Universitätsfrauenklinik Gießen für ihre gute Kooperation, die Bereitstellung der Ejakulatproben, der Follikularflüssigkeit und die Überlassung von SpermioGRAMMdaten und Fertilisationsraten.
- Herrn Dr. Pabst vom Institut für Medizinische Informatik der JLU Gießen für die Hilfestellung und Beratung bei den statistischen Auswertungen.
- Den medizinisch-technischen Assistentinnen des andrologischen Labors der Universitätshautklinik für die Erstellung der SpermioGRAMMdaten.
- Meinen Kolleginnen (Petra Baltes, Nadja Mertens, Anette Hantschke, Gabi Braun, Ellen Zwartenkot, Brigitte Seefeld-Schmidt, Sabine Hornik, Heike Schmidt) und Kollegen (Uwe Schalles, Michael Thomas, Kai Friedrich und Mahmoud Mahmoud) für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre im andrologischen Labor, die sich positiv auf das Gelingen meiner Arbeit ausgewirkt hat.
- "Last not least" meinen Eltern für deren Vertrauen in meinen Beruf und deren geistige und materielle Unterstützung.

10. LEBENS LAUF

Name: Müller
 Vorname: Christina Heike
 Geburtsdatum: 28. Oktober 1967
 Geburtsort: München
 Familienstand: ledig
 Schulbildung: Grundschule in Miesbach von 1973-1977
 Naturwissenschaftliches Gymnasium in Miesbach von 1977-1987
 Abschluß: Allgemeine Hochschulreife im Mai 1987
 Studium: Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen von 1987-1994
 Vorexamina: Ärztliche Vorprüfung im September 1989
 I. Teil der Ärztlichen Prüfung im September 1990
 II. Teil der Ärztlichen Prüfung im April 1993
 III. Teil der Ärztlichen Prüfung im November 1994
 Approbation als Ärztin: 01.10.1996
 Berufsbezogene Tätigkeit:

- Im Rahmen des Studiums zwischen 1990 und 1992
 Famulaturen im Fachgebiet
 - Chirurgie im Lehrkrankenhaus Lich/Gießen; Dermatologie in der Universitätshautklinik Gießen;
 - Innere Medizin und Kardiologie im Balserischen Stift Gießen;
 - Innere Medizin im Krankenhaus Vincentinum Ruhpolding
- Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universitätshautklinik Gießen 01.06.-30.09.1993.
- Im Rahmen des Studiums zwischen 1993 und 1994
 Absolvierung des praktischen Jahres im Fachgebiet
 - Innere Medizin im Lehrkrankenhaus Bad Hersfeld/Gießen
 - Chirurgie an der Universität von Malta
 - Dermatologie an der Universität Gießen

- Hospitanz in der Alexanderklinik Davos/Schweiz .01-.02.1995

Berufliche Tätigkeit: Vom 03.04.1995-30.09.1996 Ärztin im Praktikum an der
Universitätshautklinik Gießen

Vom 01.10.1996-30.09.1997 Assistenzärztin für Dermatologie
an der Universitätsklinik Gießen

Vom 01.11.1997 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen
einer Postdoktoranden-Stelle an der Washington University,
School of Medicine, Missouri, Department for Pathology,
Laboratory Medicine, unter Leitung von Herrn Prof. J. Milbrandt,
M.D., Ph.D.